

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání – Biologie se zaměřením na vzdělávání



Eliška Šinknerová

Marfanův syndrom, hlavní genetické příčiny
Marfan syndrome, the main genetic causes

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Olga Rothová, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Děkuji RNDr. Olze Rothové, Ph. D., vedoucí této práce, za laskavé a podpůrné vedení. Za poskytnuté informace, zdroje a doporučení, která mi umožnila lépe proniknout do tématu, kterým jsem se zabývala.

Děkuji Filipovi, za psychickou podporu, poslouchání mých stížností, spojených s tvorbou této práce a za korektury.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je rešerší odborných zdrojů týkajících se tématu Marfanova syndromu (dále také MFS), který prozatím nebyl v české odborné literatuře dostatečně popsán. Úvodní kapitoly se věnují všeobecným informacím a historii výzkumu MFS, jehož první popis byl zveřejněn v roce 1896 a další výzkum pokračoval do 90. let 20. století, kdy bylo středem zájmu mapování projevů a zjištění hlavních genetických příčin MFS. Výzkum nadále pokračuje do současné doby a je zaměřen na hledání konkrétních mutací způsobujících tento syndrom.

Následně práce mapuje klinické projevy a symptomy jak klasického, tak neonatálního Marfanova syndromu, například projevy v mnoha tělních soustavách, jako jsou kosterní, kardiovaskulární, dýchací a další. Práce se zabývá rovněž procesem, který umožňuje Marfanův syndrom diagnostikovat. Těžiště práce spočívá v popisu molekulární podstaty tohoto syndromu a genetických aspektů. Podrobně popisuje gen *FBNI* a různé typy mutací, které jsou zodpovědné za vznik MFS. Pozornost je věnována také korelacím genotypu/fenotypu.

Do této práce jsou také zahrnuty návrhy možností jak využít tematiku Marfanova syndromu ve výuce na středních školách a gymnáziích.

Klíčová slova

Marfanův syndrom, mutace genu *FBNI*, fibrilin – 1, fibrilin – 2, Ghentova nosologie, fenotypové korelace, patogeneze

Abstract

This thesis is a review with the topic of Marfan syndrome (MFS) that hasn't been sufficiently described in Czech scientific literature yet. The first chapters pursue general informations and history of research of MFS, which was first described in 1896 and following research continued. During 1990s the main interest was to describe manifestations of Marfan syndrome and to find main genetic causes. Research continues until today and it is focused on searching specific mutations causing this syndrome.

The thesis furthermore describes clinical manifestations classical MFS and neonatal MFS, e. g. manifestations in many body systems as sketal, cardiovascular, pulmonar and other systems. Thesis is focused on process which enables to diagnose MFS. The main part of the thesis is a desctiption of molecular nature and genetic aspects of this syndrome. The thesis describes in detail gene *FBNI* and different types of mutationon which are responsible for formation of MFS. Attention is paid to genotype/phenotype correlation.

This thesis also includes suggestions for work with this topic (MFS) in teaching at high schools and grammar schools.

Key words

Marfan syndrome, gene *FBNI* mutations, fibrillin – 1, Fibrillin – 2, Ghent nosology, phenotype correlation, pathogenesis

Obsah

Seznam zkratk.....	7
1. Úvod.....	9
2. Historie výzkumu.....	11
3. Klinické projevy a symptomy.....	13
3.1. Klinické projevy a symptomy klasického Marfanova syndromu.....	13
3.2. Klinické projevy a symptomy neonatálního MFS.....	15
4. Diagnostika Marfanova syndromu.....	16
5. Molekulární podstata MFS.....	18
6. Genetické aspekty Marfanova syndromu.....	24
6.1. Gen kódující fibrilin – 1.....	24
6.2. Mutace v genu <i>FBNI</i>	25
6.2.1. Mutace způsobující záměny cysteinu.....	26
6.2.2. Mutace způsobující záměnu jiných aminokyselin než cysteinu.....	27
6.2.3. Intronové mutace.....	27
6.2.4. Delece celého genu, exonu 1 nebo exonu 65.....	27
6.2.5. Předčasné zařazení terminačního kodonu.....	27
6.2.6. Dvě různé mutace v genu <i>FBNI</i> , projevy u recesivních homozygotů.....	28
6.3. Gen <i>FBN2</i>	28
6.4. Geny <i>TGFBR1</i> a <i>TGFBR2</i>	28
6.5. Latentní transformující růstový faktor – beta vázající protein (LTBP).....	29
6.6. Fenotypové projevy – korelace mezi genotypem/fenotypem.....	29
7. Diskuze.....	32
8. Závěr.....	34
9. Přehled literatury.....	35

Seznam zkratk

cbEGF = vápník vázající epidermální růstový faktor

cDNA = komplementární deoxyribonukleová kyselina

DNA = deoxyribonukleová kyselina

DHPLC = denaturující vysoko – výkonová kapalinová chromatografie

ECM = extracelulární matrix

EDS = Ehlersův –Danlosův syndrom

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

EGF – like motiv = motiv podobný epidermálnímu růstovému faktoru

FBN1 = fibrilin – 1

FBN2 = fibrilin – 2

kDa = kilodalton

LDS = Loyes – Dietzův syndrom

LTBP = velký transformující růstový faktor vazebný protein

MAGP -1 = s mikrofibrilami asociovaný protein 1

MAPK = mitogenem aktivovaná kaskáda proteinové kinázy

MASS fenotyp = onemocnění způsobující mutace genu *FBN1*, obdobné MFS (M = mitral valve prolapse, A = aorta, S = skin and S = skeletal features)

MFS = Marfanův syndrom

motiv TGF β 1bp = 8 – cys = latentní transformační růstový protein vázající faktor β 1

MR = magnetická rezonance

mRNA = messengerová ribonukleová kyselina

MVP = prolaps mitrální chlopně

nMFS = neonatální Marfanův syndrom

PCR = polymerázová řetězová reakce

PTC = předčasné zařazení terminačního kodonu

RGD = arginin – glycin – aspargová kyselina

RhoA = člen rodiny homologů Ras A

RTG = rentgen

SDG = Shprintzen – Goldberg syndrom

SMAD = hlavní převodníky signálu pro receptory transformujícího růstového faktoru

TAA = hrudní aortální aneurysma

TGF – β = transformující růstový faktor beta

TGFBR1 = receptor transformujícího růstového faktoru 1

TGFBR2 = receptor transformujícího růstového faktoru 2

TGFBR3 = receptor transformujícího růstového faktoru

1. Úvod

Marfanův syndrom (MFS) je geneticky podmíněná porucha tvorby pojivové tkáně, která je děděna převážně autozomálně dominantně. Tento syndrom postihuje především kosterní, kardiovaskulární systém a oči. Typickými projevy jsou disekce hrudní aorty, ectopia lentis a arachnodaktylie (SAKAI *et al.* 2016). Příčinou těchto změn jsou mutace genu *FBNI* (fibrilin1) ležícího na dlouhém raménku chromozomu 15 (ROBINSON 2000). Změny v sekvenci tohoto genu mají za následek změnu struktury molekuly fibrilinu. Jedná se o makromolekulu, jejíž polymerací dochází ke vzniku mikrofibril, které se vyskytují ve všech pojivových tkáních. Dochází tak k narušení struktury extracelulární matrix, které pak způsobuje výše uvedené projevy v různých orgánech (FRANKEN *et al.* 2014).

Marfanův syndrom má vysoce variabilní projevy a je způsoben více jak 2900 mutacemi (FRANKEN *et al.* 2014). Tyto mutace se překrývají s jinými chorobami, které postihují pojivovou tkáň (např. Loeys – Dietzovým syndromem). Zároveň je také 90% z těchto více jak 2900 mutací specifických pro daného jednotlivce či rodinu (HOFFJAN 2012).

Neléčený Marfanův syndrom může vést až ke smrti pacienta. Nejčastější příčinou jím způsobeného úmrtí je disekce aorty (ROBINSON 2000). Nejzávažnější formou tohoto syndromu je novorozenecký Marfanův syndrom, u kterého byla popsána snížená exprese decorinu (SUPERTI – FURGA *et al.* 1992).

Diagnostika tohoto syndromu je založena na Ghentových kritériích. V současné době se využívá revidovaná forma těchto kritérií, která byla publikována v roce 2010. Touto revizí byla dána větší váha genetickému testování při diagnóze MFS. Využívány jsou i korelace mezi jednotlivými projevy a genetickým základem – jako je například korelace mezi mutací, která způsobuje záměnu cysteinu a jiné aminokyseliny a ectopia lentis, či korelace mezi úplnou delecí, kardiovaskulárními a skeletálními symptomy a nepříliš častým výskytem ectopia lentis apod. Úskalím při diagnostikování může být velká fenotypová rozmanitost, která se projevuje například v době nástupu symptomů, a jejich závažnosti (FRANKEN *et al.* 2014, BENARROCH *et al.* 2019).

Hlavním cílem této bakalářské práce je:

- Popsat patogeneze Marfanova syndromu, korelace mezi jednotlivými projevy a genotypem a zaměřit se na diagnostické metody a systémy, se kterými se při diagnostice pracuje.
- Zmapovat literární zdroje o genetických příčinách Marfanova syndromu. Konkrétně způsoby dědičnosti, genetické mapování a vývoj zkoumání mutací, které tento syndrom způsobují, se zaměřením na molekulárně genetické aspekty.
- Nastínit možnost využití poznatků o Marfanově syndromu ve výuce genetiky na druhých stupních základních škol či na gymnáziích.

2. Historie výzkumu

Marfanův syndrom je onemocnění, kterým podle historických pramenů trpělo i několik významných osobností – Nicolo Paganini, Abraham Lincoln nebo faraon Achnaton. Nemocní často byli zobrazováni či popisováni jako velmi vysocí s dlouhými končetinami a obličejem (TOMO 2008).

První popis projevů Marfanova syndromu byl zveřejněn v roce 1896 Antionem-Bernardem Marfanem – francouzským pediatrem, po kterém byl tento syndrom pojmenován. Článek byl uveřejněn v bulletinu lékařské společnosti v Paříži a týkal se pětileté dívky s arachnodaktylií (dlouhé tenké prsty) a jinými typickými znaky (GOTT 1998). Během let dalších výzkumů bylo popsáno mnoho dalších projevů jako například ectopia lentis (dislokace oční čočky), strie na kůži a mnoho kardiovaskulárních projevů (prolaps mitrální chlopně, aneurysma – neboli ohraničené rozšíření tepny – aortálního kořene a další) (VERSTRAETEN *et al.* 2016).

V roce 1943 Helen Taussigová upozornila na spojení mezi Marfanovým syndromem a aortální medionekrózou (DESAI *et al.* 2011). Ve stejném roce byla také poprvé popsána asociace MFS s aortální diskací Lewisem E. Etterem (HANSEN *et al.* 2004).

V 50. letech byly popsány McKusickem a jeho spolupracovníky genetické faktory, které stojí za vznikem MFS. Přesná lokalizace genů však trvala několik desetiletí (VERSTRAETEN *et al.* 2016). Hlavní pokrok byl učiněn v roce 1991, kdy byl objeven gen *FBN1* (DIETZ *et al.* 1991). Pozdější výzkumy určily přesnou lokaci do oblasti *ch15q15-15q21.1* (VERSTRAETEN *et al.* 2016). V genu kódujícím protein fibrilin – 1 bylo nalezeno 2900 různých mutací a počet těchto mutací se s vysokou pravděpodobností bude zvyšovat (FRANKEN *et al.* 2014). Většina těchto mutací je specifická pro jednotlivé rodiny s výskytem Marfanova syndromu (VERSTRAETEN *et al.* 2016).

Výzkum MFS je značně komplikován signifikantním klinickým překryvem s projevy dalších poruch, jako jsou Loyes – Dietzův syndrom (LDS) nebo Phrintzen – Goldberg syndrom (SDG). LDS byl uznán jako samostatná diagnóza v roce 2006. Hlavními příznaky tohoto příbuzného syndromu jsou kraniosynostóza (typ vývojové vady mozku), rozštěpený čípek, rozštěp patra, aneurysmata, ruptury a další.

K diagnostice MFS je používána Ghentova škála, která byla v roce 2010 revidována, tak aby lépe vyhovovala překryvům klinických projevů. Další výzkum byl zaměřen na hledání

genotypových – fenotypových korelací, které pomáhají v diagnostice, genetickém poradenství či personalizované chirurgii (VERSTRAETEN *et al.* 2016).

3. Klinické projevy a symptomy

3.1. Klinické projevy a symptomy klasického Marfanova syndromu

Marfanův syndrom je autozomálně dominantně děděná porucha pojivové tkáně, u které dochází k postižení především kosterního, očního a kardiovaskulárního systému (PYERITZ 1993, GRAY a DAVIES 1996). Postižen také může být plicní, nervový systém a integumentární fibrily (PORCIANI *et al.* 2004). Zasažena může být také dura mater (tvrdá plena mozková). Mezi jednotlivými pacienty se často objevují signifikantní rozdíly (např. v čase nástupu projevů, postižení různých tkání či závažnosti postižení (LOEYS *et al.* 2010). Mohou se objevit i nekompletní projevy, kdy pacient nesplňuje všechna diagnostická kritéria (SAKAI *et al.* 2016).

U postižených se objevuje typický marfanoidní habitus, který způsobují postižení kosterního (resp. muskuloskeletálního) systému, zahrnující širokou škálu abnormalit, například - arachnodaktylii, skoliózu, deformity hrudníku jako je pectus carinatum (ptačí hrudník) nebo pectus excavatum (nálevkovitý hrudník), ligamentózní laxicita (volnost vazů), abnormální mobilita kloubů, protrusio acetabulae (intrapelvicový přesun acetabula a caput femoris), kamptodyktylii (trvalé ohnuté jednoho nebo více prstů), pes planus (ploché nohy), kontraktozitu kloubů, kyphoskoliózu či muskulární hypotonii (svalovou slabost) (SPONSELLER *et al.* 1995, HOFFJAN 2012).

Skolióza se projevuje u 60 % pacientů s diagnózou MFS (SPONSELLER *et al.* 1995). Značný rozvoj tohoto symptomu může nastat během pubertálního spurtu, tento prudký vývoj může vést k významným deformitám, bolestem a k omezení dýchání. V dospělosti se pak objevuje třikrát častěji než u zdravé populace bolest zad (PYERITZ a FRANCKE 1993). K rozvoji skoliózy může dojít i v dospělosti, zvláště v případech, kdy je úhel zakřivení páteře větší než 40 stupňů (DEAN 2007).

Častým projevem je také hypermobilita kloubů, vyskytuje se u 85 % dětí a 56 % dospělých a je spojená s výskytem arthralgie a myalgie či úrazů ligament (GRAHAME a PYERITZ 1995).

MFS postihuje i oči pacienta. Nejčastěji se objevuje ectopia lentis a většinou bývá bilaterální (CROSS 1973). Vyskytuje se u 60 % pacientů a často bývá způsobena slabostí zonula ciliaris

(SAKAI *et al.* 2016). Dalším symptomem může být také myopie (28 %) či oddělení sítnice (0,78 %) (LOEYS *et al.* 2004). Myopie je spojena s prodloužením oční koule a se zvýšením rizika odchlípnutí sítnice. Pokud je provedena včasná korekce (do 12 let) neobjeví se u pacienta amblyopie, pokud ale ke korekci dojde později, zraková ostrost se plně neobnoví (PYERITZ a McKUSICK 1979).

Objevit se může i dislokace čočky do přední komory (MAUMENEE 1981).

Nejzávažnějším projevem bývají kardiovaskulární manifestace nejčastěji postihující atrioventrikulární chlopně a aortu. Časné projevy mohou zahrnovat postižení mitrálních chlopní (GRAY a DAVIES 1996).

Častým a velmi vážným postižením, které vede k úmrtím pacientů, je aortální aneurysma, tedy lokální dilatace aorty (GRAY a DAVIES 1996, CURY *et al.* 2013). S aortálním aneurysmatem a disekcí je spojeno 80 % úmrtí pacientů s diagnózou MFS (PORCIANI *et al.* 2004). Aby se jednalo o aortální aneurysma, musí dojít ke zvětšení průměru této cévy na jeden a půl násobek normální hodnoty (tedy průměr vyšší než 3,5 cm). Aneurysmata lze klasifikovat podle jejich polohy jako hrudní (lokalizována nad diaphragmou) a abdominální (pod diaphragmou), která mají vyšší prevalenci. U MFS dilatace často postihuje aortální kmen a může se rozšířit do aorta ascendens a nejvyšších hodnot průměru dosahuje v oblasti sinu Valsalva (oblast aortální chlopně) (GRAY a DAVIES 1996, CURY *et al.* 2013).

Další závažnou kardiovaskulární komplikací je disekce aorty. Riziko jejího výskytu se značně zvyšuje, pokud dilatace v oblasti sinu Valsalva dosáhne hodnoty 5 cm, popřípadě pokud dochází ke zvyšování dilatace o 1,5 mm za rok. Hlavní podmínkou pro rozvoj disekce je degenerace aortální stěny (konkrétně v mediální vrstvě), která je dále zhoršována mechanickým stresem, který způsobuje průtok krve (SHORES *et al.* 1994, GROENINK *et al.* 1999, LEGGET *et al.* 1996). Aortální disekce může způsobit aortální regurgitace nebo aortální ruptury, které způsobují náhlou smrt (GRAY a DAVIES 1996).

Dalším systémem, který může být zasažen MFS, je dýchací. Toto postižení se může projevit ve výskytu spontánních pneumothoraxů (u 4 – 11 % pacientů), které mohou být spojeny s apikálními bulami (drobnými dutinami, které jsou vyplněny vzduchem a mezi parenchymem plic a viscerální pleurou) (HALL *et al.* 1984, WOOD *et al.* 1984; CHOI 2014).

U dvou třetin pacientů se objevuje pectus excavatum, pokud je tento projev závažný, je spojen s dýchacími problémy (SCHERER *et al.* 1988; STREETEN *et al.* 1987).

U dospělých pacientů se vyskytuje zvýšená tendence ke kolapsům horních dýchacích cest a je spojena s kraniofaciálními abnormalitami. Kolapsy zapříčiňují spánkovou apnoe (CISTULLI *et al.* 2001).

Klinické projevy mohou zahrnovat také anteriorní sakrální meningokélu, (VOYVODIC *et al.* 1999) vysoké patro se stáčením zubů, distenzi kožních strií či recidivující kýlu (GRAY *et al.* 1998).

3.2. Klinické projevy a symptomy neonatálního MFS

Neonatální Marfanův syndrom (nMFS) je charakterizován sérií vážných a vzácných projevů a reprezentuje nejvýznamnější část spektra MFS. Smrt dětí je na rozdíl od dospělých pacientů nejčastěji způsobena kongestivním selháním srdce kvůli mitrální a trikuspidální regurgitaci.

Obvykle je nMFS diagnostikován krátce po narození. Typickými symptomy, které se objevují, jsou mitrální a trikuspidální insuficience, kongestivní selhání srdce, plicní emfyzém, kloubní kontrakty, deformity uší či volná kůže (BOOMS *et al.* 1999, GODFREY *et al.* 1995). Dle kazuistiky (mužský proband narozený v 39. gestačním týdnu, k jeho úmrtí došlo po 20 hodinách) se vyskytují i další symptomy jako arachnodaktylie (obou rukou i nohou), hyperlaxita kloubů prstů, klinodaktylie třetích prstů nohou, volná kůže vytvářející senilní vzhled, absence subkutánního tuku a hypoplazie lýtkových svalů (BUNTINX *et al.* 1991).

4. Diagnostika Marfanova syndromu

K diagnostice MFS se nejčastěji používá tzv. „Ghent nosology – Ghentova nosologie“. Jedná se o diagnostický nástroj, který je využíván od roku 1996 a v roce 2012 byl revidován. Jeho součástí je definice Marfanova syndromu, resp. jeho klinických projevů, a také jsou zde ustanoveny poruchy, které musí být od něj odlišeny – tedy Loeys – Dietzův syndrom, MASS fenotyp, prolaps mitrální chlopně (MVP), Ehlersův – Danlosův syndrom (EDS) (ROBINSON *et al.* 2006).

Ghentova nosologie definuje hlavní a vedlejší kritéria a hodnotí, zda klinické postižení systému představuje kritérium hlavní či vedlejší. Aby byl MFS pacientovi diagnostikován, je vyžadováno hlavní kritérium ve dvou tělních systémech a zapojení třetího systému. Hlavní kritéria mohou představovat postižení kardiovaskulárního, očního, kosterního systému, dura mater (tvrdé pleny mozkové) a patří sem i rodinná historie. Za vedlejší kritérium pak může být považováno postižení plicního systému a kůže (DE PAEPE *et al.* 1996).

Diagnóza MFS může být přisouzena také na základě hodnoty skóre. Jednotlivá klinická postižení jsou obodována, a pokud celkové skóre přesahuje hodnotu 7, je pacientovi diagnostikován Marfanův syndrom (ROBINSON *et al.* 2006).

K diagnostice je využíváno také několik vyšetřovacích technik – pro kardiovaskulární hodnocení je potřeba zjistit průměr aorty (v oblasti sinu Valsalva), k čemuž se používá transthorakální echokardiografie (ROMAN *et al.* 1993). Dále může být užitečná transoesophageální echokardiografie nebo MR (magnetická rezonance) či RTG vyšetření (YULE *et al.* 1999).

Velmi významným diagnostickým nástrojem je molekulární analýza genu *FBNI*. K této analýze bylo využíváno mnoho metod s různou účinností. Metoda, která má jedny z nejlepších výsledků pak je DHPLC (denaturující vysoko-výkonová kapalinová chromatografie) (ROBINSON *et al.* 2006). Ukazuje se také, že pokud pacient splňuje klinickou diagnózu, jedná se o dobrý predikční ukazatel pro výsledek mutační analýzy. (KATZKE *et al.* 2002).

Diagnostika pomocí Ghentovy nosologie zahrnuje několik úskalí – MFS je široce fenotypově variabilní, může se tedy stát, že pacient je poddiagnostikován. I přes tento problém je většina postižených diagnostikována správně (PEREIRA *et al.* 1994). Dalším úskalím pak může být

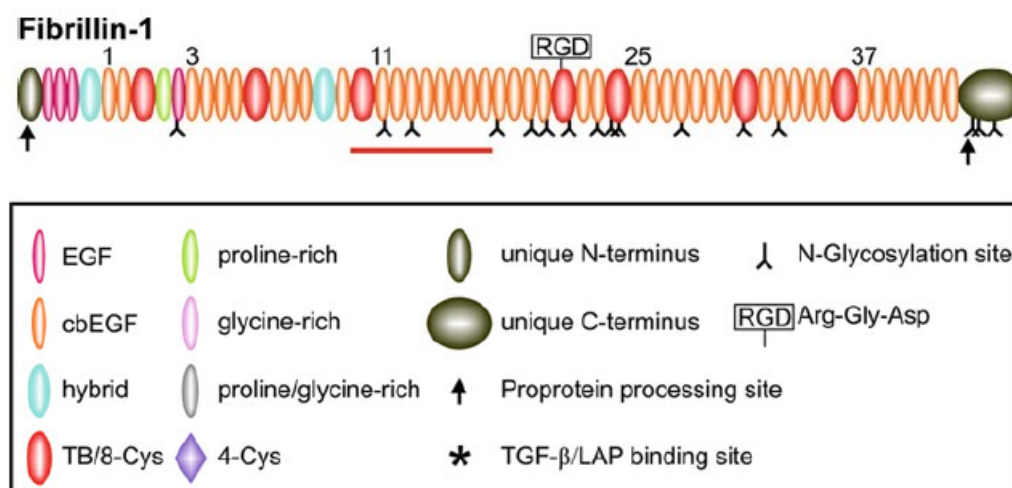
diagnostika u dětí – zapojení jednotlivých systémů je totiž závislé na věku a symptomy v daném systému se tedy nemusí ještě projevovat. Značné potíže může způsobit také překryv s dalšími MFS podobnými onemocněními (ROBINSON *et al.* 2006).

Dřívější verze Ghentovy nosologie neobsahují dělení na minoritní a majoritní kritéria. Diagnóza je pacientovi přisouzena na základě výskytu dilatace aortálního kmene a jednoho dalšího kritéria – ectopia lentis, *FBN1* mutace, rodinné historie, skóre vyššího než 7. MFS mohl být také diagnostikován u kombinací rodinné historie a ectopia lentis nebo skóre vyššího než 7 (LOEYS *et al.* 2010).

Oproti původním verzím Ghentovy nosologie se také objevují rozdíly v definicích jednotlivých poruch a některé symptomy byly z klasifikace odstraněny či byla snížena jejich důležitost. Objevuje se také názor, že revidované verze mohou zpozdit definitivní diagnózu, ale zároveň snižuje riziko předčasné či chybné diagnózy (LOEYS *et al.* 2010). Při ověřování shodnosti mezi revidovanou a nerevidovanou verzí byla však zjištěna vysoká shodnost (FAIVRE *et al.* 2012).

5. Molekulární podstata MFS

Marfanův syndrom je způsoben mutací v genu *FBNI*. Tato mutace způsobuje vznik abnormálního fibrilinu – 1 (ROBINSON 2000). Jedná se o monomerní glykoprotein, který obsahuje velké množství cysteinu. Molekulová hmotnost fibrilinu – 1 je asi 350 kDa (SAKAI *et al.* 1991).



obrázek č. 1: Organizace molekuly lidského fibrilinu – 1. Jsou zde znázorněna vazebná místa (RGD), čísla nad schématem ukazují relativní počet domén cbEGF (červený pruh vymezuje oblast, ve které se objevují mutace způsobující novorozenecký MFS) (převzato z HUBMACHER a REINHARDT 2010).

Fibrilin je protein, který je obsažen v mikrofibrilách elastických vláken (obrázek č.1) (SAKAI *et al.* 1986). Mikrofibrily fungují jako lešení pro ukládání tropoelastinu a tvorbu elastických vláken (RAGHUNATH *et al.* 1996), dále jsou rozšiřitelné (KEENE *et al.* 1991), mohou pomáhat při přerozdělování zátěže mezi jednotlivými elastickými vlákny (LILLIE *et al.* 1998), také zajišťují strukturální ukotvení v neelastických tkáních (jako zonula ciliaris) (WHEATLEY *et al.* 1995), dále také mohou sloužit k ukotvení endotelu a epitelových buněk k elastickým vláknům ECM (SAKAMOTO *et al.* 1996). Další jejich funkcí je adheze (ROSS *et al.* 1998) a slouží také jako mechanická kotva u epitelálních – mezenchymálních rozhraní (např. dermální – epidermální rozhraní) (HAYNES *et al.* 1997). Fibrilinové mikrofibrily mají charakteristickou morfologii – skládají se ze světlých, tmavých nebo dutých oblastí (což způsobuje vzhled „železniční trati“). Jsou uspořádány do svazků mikrofibril, ale mohou se vyskytovat i jednotlivě. Uspořádání se liší dle funkčních nároků tkáně, ve které

se nacházejí – v kůži se vyskytují jako propojená volná síť, ve šlachách probíhají paralelně s podélnou osou apod (SAKAI *et al.* 2016).

Fibrilinové mikrofibrily jsou klíčové pro strukturální integritu stěny aorty a závěsného vazu čočky (SAKAI *et al.* 2016).

V mikrofibrilách je kromě fibrilinu – 1 a 2 přítomno také množství jiných proteinů, například s mikrofibrilami asociovaný glykoprotein 1 (MAGP – 1) (GIBSON *et al.* 1991). Při studiu jeho role u pacientů s MFS, kdy byly použity protilátky jak proti fibrilinu, tak proti MAGP – 1, byl pozorován u obou látek stejný vliv. Mutace u MAGP – 1 ale nejsou hlášeny (GIBSON *et al.* 1996).

Profibrilin – 1 se skládá ze signálního peptidu pro extracelulární sekreci a pěti strukturně odlišných domén (A – E). Složení domén B a D je založeno na opakování motivů několika typů.

První typ se nazývá motiv podobný epidermálnímu růstovému faktoru (EGF – like) a ve fibrilinu – 1 je obsažen 47krát. Čtyřicet tři z těchto opakování také obsahuje navázaný vápník – vápník vázající motivy podobné EGF (cbEGF). EGF motivy také zahrnují šest vysoce konzervovaných cysteinových zbytků, které mezi sebou tvoří disulfidové můstky.

Druhý strukturální motiv, který se vyskytuje je podobný latentnímu transformačnímu růstovému proteinu vázajícímu faktor $\alpha 1$ (motiv LTBP), lze ho nazývat také 8 – cys nebo TGF $\alpha 1$ bp motiv. Jak lze vyčíst z pojmenování 8 – cys motiv, obsahuje tento osm cysteinových zbytků. Modul LTBP se ve fibrilinu vyskytuje 7 (přerušují globulární strukturu cbEGF, čímž vytvářejí tyčovité struktury) (YUAN *et al.* 1997). Vyskytuje se zde také LTBP motiv obsahující RGD buněčné adhezivní motivy (RGD – arginin – glycin – aspargová kyselina), které zprostředkovávají buněčnou adhezi prostřednictvím integrinů (interagují s prvky cytoskeletu a proteiny extracelulární matrix a zprostředkovávají tak ukotvení buňky v ní) (HYNES 1992).

Třetí strukturální motiv zahrnutý v molekule fibrilinu je pojmenován jako motiv Fib (REINHARDT *et al.* 1996) a představuje fúzi částí EGF a LTBP motivů (PEREIRA *et al.* 1993). Obsahuje osm cysteinových zbytků, štěpné místo (REINHARDT *et al.* 1996) a je následován motivem A (12 základních aminokyselin s neznámým funkčním významem).

Začátek domény B je podobný Fib motivu (obsahuje ale čtyř - cysteinový motiv). Dále se pak tato doména skládá také z ne vápník vázajících motivů podobných EGF a cbEGF, devíti cysteinových derivátů Fib motivu a LTBP – podobného motivu.

Doména C obsahuje neobvykle vysoké množství prolinu, což může umožňovat její trojrozměrné ohýbání a fungování jako molekulový závěs (YIN *et al.* 1995).

Další doménou je doména D, která je největší. Obsahuje 49 opakování aminokyselin s vysokým zastoupením cysteinu (znovu se zde vyskytují motivy cbEGF, motivy podobné LTBP a motiv Fib).

Poslední doménou, která ještě nebyla zmíněna je doména E na karboxy – konci. Je tvořena sekvencí po sobě jdoucích párů cysteinových zbytků. Tato struktura je vysoce konzervována mezi fibrilinem – 1 a 2, což naznačuje možnost jejího velkého funkčního významu (ZHANG *et al.* 1994).

Vznik zralých mikrofibril zahrnuje zpracování profibrilinů (které je regulováno zralým fibrilinem), montáž, regulační mechanismy, zesílení a zrání mikrofibril. V průběhu tohoto procesu dochází v montáži mikrofibril u pacientů s podmnožinou mutací ve fibrilinu – 1 k chybám. Jejich dermální fibroblasty pak vykazují změněné nebo kvalitativně nedokonalé fibrilinové sítě. K chybám v montáži pravděpodobně dochází v počátcích tohoto procesu. U pacientů s MFS je zpracování profibrilinů narušeno na jejich C – konci, což narušuje začlenění mutovaného proteinu do ECM. Zesílení je zprostředkováno dvěma typy vazeb – redukovatelnými disulfidovými vazbami a neredukovatelnými lysinovými, které jsou katalyzovány transglutaminázami. Mutace, které naruší transglutaminázová síťovací místa, má vážné důsledky pro montáž a stabilitu mikrofibril. Vznik mikrofibril je katalyzován množstvím dalších molekul. Například interakcí s heparinem/heparin sulfátem, který má regulační účinek při montáži mikrofibril, inhibuje totiž zesíťování (ROBINSON *et al.* 2005).

Při montáži mikrofibril hraje důležitou roli hybridní modul 8 – Cys, který zprostředkovává intramolekulární disulfidovou vazbu mezi monomery fibrilinu – 1 (REINHARDT *et al.* 2000).

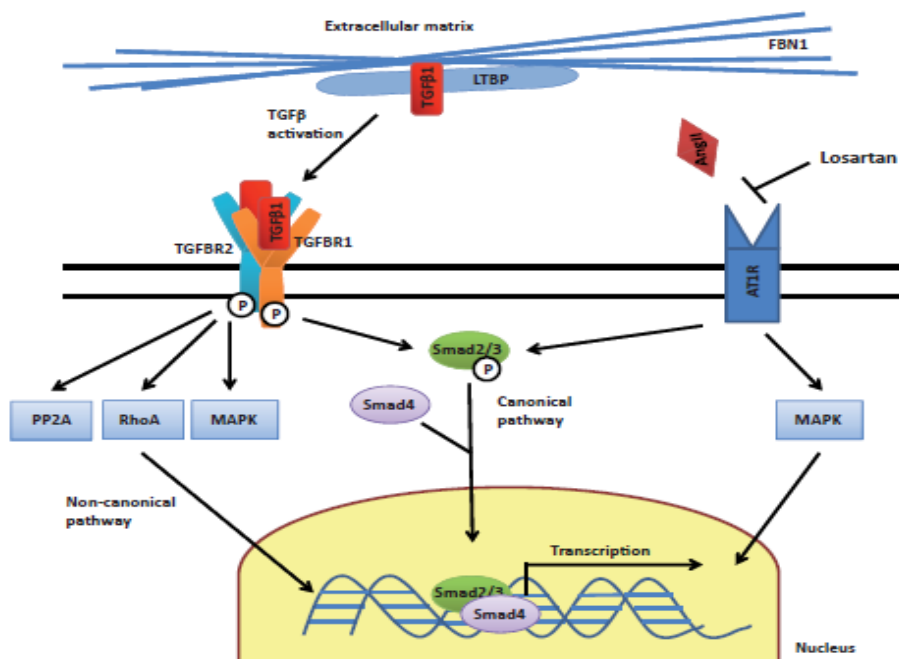
Podrobnosti molekulární architektury fibrilinu – 1 nejsou zcela jasné. Existuje několik modelů, které popisují možná uspořádání. Např. model „pantu“ předpokládá zrání od hlavy

k ocasu (jeho vyrovnaní) a vznik oblasti, která by umožnila zesílení a zabalení do energeticky příznivějších forem (ROBINSON *et al.* 2005).

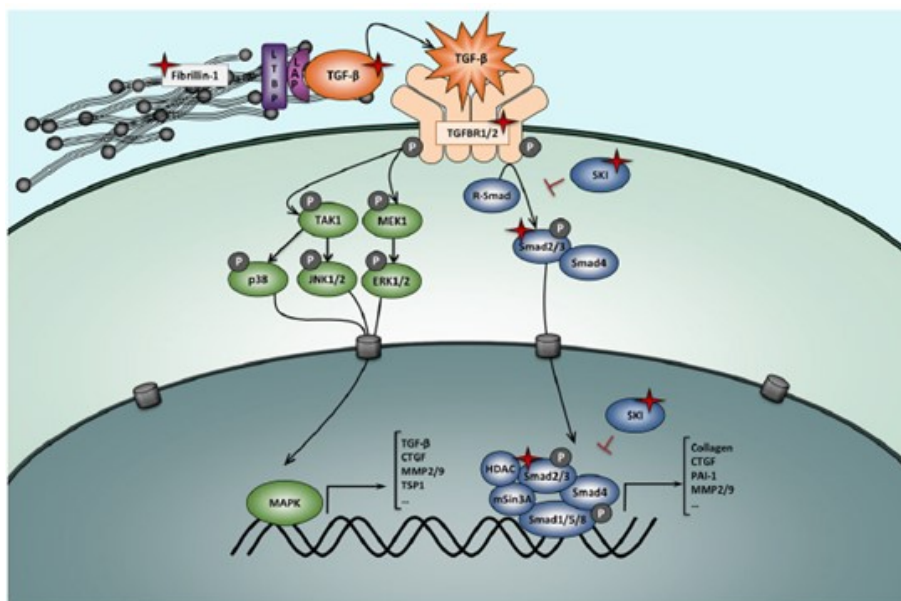
Pokud je fibrilin - 1 abnormální, může vykazovat nižší afinitu k TGF – β , jehož množství, přítomné v ECM, je pak vyšší. Tento protein pak aktivuje své receptory a transkripční modulátorové proteiny (SMAD). Transkripční reakce vyvolané touto aktivací pak způsobí typické projevy MFS. Jedná se o tzv. kanonickou dráhu. Projevy MFS mohou být vyvolány také tzv. nekanonickými dráhami. Například RhoA a mitogenem aktivovanou kaskádou proteinové kinázy (MAPK) (ROBINSON, 2000).

Signalizace TGF – β je zvýšena např. v aortální stěně u pacientů s MFS (JONES *et al.* 2009). Tato zvýšená hladina nemusí být původcem problému, ale výsledkem chorobného stavu aorty (FRANKEN *et al.* 2014).

TGF – β , jehož množství v ECM je ovlivněno množstvím normálního fibrilinu – 1, je polypeptid, který se skládá ze tří vysoce konzervovaných dimerních proteinů a je přítomen u všech eukaryot. Signalizace, zajištěná tímto polypeptidem, reguluje mnoho buněčných procesů (proliferace, apoptóza, diferenciace, formování a přestavba ECM). Tento signál je zprostředkován prostřednictvím receptorů – receptor TGF – beta typu 1 a 2 (TGFB1 a TGFB2) (VERSTRAETEN *et al.* 2016, GIUSTI *et al.* 2016, PEPE *et al.* 2016). Vazba TGF – beta na TGFB2 vede k aktivaci a fosforylaci TGFB1. Tato má za následek aktivaci transkripčních faktorů Smad2/3. Po spojení se Smad4 vstupují do jádra a zvyšují transkripci cílových genů (kanonická cesta viz obrázek č.2). Fibrilin – 1 může regulovat dostupnost TGF, a to interakcí s velkým TGF – vazebným proteinem (LTBP). To zabraňuje nadměrné signalizaci a zdá se, že tento proces je u MFS narušen (viz obrázek č. 3), což vede k objevu aortálního aneurysmatu (HOFFJAN 2012). Mutace v receptorech TGFB1 a 2 je zodpovědná za mnoho poruch pojivové tkáně (viz kapitola 6) (VERSTRAETEN *et al.* 2016, GIUSTI *et al.* 2016, PEPE *et al.* 2016). V poslední době byla také objevena korelace mezi expresí proteinu TGFB3 a signalizací TGF – β . Zatím však nebyla přesně objasněna úloha TGFB3 v patologii MFS, je ale zvýšeno jeho množství. Protein TGFB3 je exprimován na endoplasmatickém retikulu nebo ve vezikulách (GROENEVELD *et al.* 2018).



Obrázek č. 2: Dráha signalizace TGF - β (převzato z HOFFJAN 2012).



Obrázek č. 3: Narušení signální dráhy TGF- β u MFS a dalších souvisejících poruch. Narušení jsou označena hvězdičkou. Modrá barva označuje kanonické a zelená nekanonické dráhy. U MFS vede mutace v *FBN1* k porušení regulace kanonické i nekanonické dráhy a vyšší expresi cílových genů TGF - β (převzato z VERSTRAETEN *et al.* 2016).

Dalším kandidátním mechanismem, který může ovlivnit mikrofibrily fibrilinu je interakce mezi molekulami latentního transformujícího růstového faktoru – beta vázajícího protein

(LTBP) a TGF – beta. Genová rodina pro tyto proteiny je strukturně příbuzná s fibriliny. *LTBP* obsahují tandemové kopie motivu cbEGF a byla zde také nalezena osmi – cysteinová opakování, které se vyskytují u fibrilinu. Zároveň je podobné také pořadí EGF motivů a osmi – cysteinových opakování. LTBP – 1 je charakterizován jako regulátor TGF – beta (SAHARINEN *et al.* 1996, GLEIZES *et al.* 1996). Je schopen ukládat TGF – beta v ECM (DALLAS *et al.* 1995, NAKAJIMA *et al.* 1997) a tato interakce (mezi LTBP – 1 a ECM) může být důležitým krokem v aktivaci TGF – beta (HORI *et al.* 1998). Dále bylo objeveno mnoho mikrofibrilárních prvků, které souvisí s fibrilinem, a proto lze geny pro LTBP považovat také za kandidátní geny pro MFS.

Všeobecně jsou projevy Marfanova syndromu spojeny se změněným množstvím fibrilinu v ECM. Při histologickém vyšetření pacientů s MFS bylo objeveno pět odlišných skupin, které vykazují různé mutace a různé hladiny fibrilinu. Např. u první skupiny pacientů se vyskytuje *FBNI* missense mutace, ale hladina syntetizovaného fibrilinu je téměř normální, snižena je ale jeho depozice do matrice. V další skupině, kde je nízká hladina mutantního transkriptu, je syntéza fibrilinu snížena na 50% a ukládání do matrice je variabilní (ELDADAH *et al.* 1995).

Dalším mechanismem, který ovlivňuje klinickou variabilitu MFS je alternativní sestřih *FBNI*. Bylo objeveno osm izoforem, v kožních fibroblastech se vyskytují jen tři (FBN1_001, FBN1_004, FBN1_009). Výskyt těchto izoforem je spojen s výskytem ectopia lentis (FBN1_004, FBN1_009), ale mechanismus alternativního sestřihu zatím není znám (BENARROCH *et al.* 2019).

6. Genetické aspekty Marfanova syndromu

Jak jsem již uvedla, Marfanův syndrom je způsoben mutacemi v genu *FBN1*, který kóduje fibrilin 1 (DIETZ *et al.* 1991). Nejčastěji se tyto mutace dědí autozomálně dominantním modelem (GRAY *et al.* 1994). Ve vzácných případech se může jednat i o mutace v genu, který kóduje receptor 1 či 2 transformujícího růstového faktoru – beta (s označením TGFBR1, TGFBR2) (MIZUGUCHI *et al.* 2004). Byla také zkoumána možnost vazby syndromu na mutaci v chromozomu 3 (3p24.2-p25). Tento gen byl ale posléze vyloučen (BOILEAU *et al.* 1993, COLLOD *et al.* 1994, DIETZ *et al.* 1995). V roce 2004 byl jako další lokus, jehož mutace způsobuje MFS, potvrzen gen v oblasti 3p24.1 (BOILEAU *et al.* 2005).

6.1. Gen kódující fibrilin – 1

Fibrilin byl objeven v roce 1986 (SAKAI *et al.* 1986) a k identifikaci genu pro *FBN1* došlo v roce 1991 a bylo k ní využito několik strategií (SAKAI *et al.* 1986). V roce 1990 byla provedena imunohistochemická studie s monoklonální protilátkou proti fibrilinu. Většina pacientů vykazovala abnormality mikrofibril v extracelulární matrix (HOLLISTER *et al.* 1990). Pomocí PCR a *in situ* hybridizace pak byl gen pro fibrilin – 1 lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 15 (15q15-21) (LEE *et al.* 1991).

FBN1 je velký gen o rozsahu kolem 200 kb DNA (BIERY *et al.* 1999), který je tvořen 65 exony, 47 EGF – like (epidermálnímu růstovému faktoru – podobnými) doménami, které obsahují šest konzervovaných cysteinových aminokyselin. Čtyřicet tři těchto domén váže vápník (DOWNING *et al.* 1996). Vazebný potenciál vápníku vázaného v těchto čtyřiceti třech doménách je podstatný při sestavování proteinu – fibrilinu 1 (SAHARINEN a KESKI 2000). Vazba vápníku stabilizuje fibrilin 1 a další proteiny extracelulární matrix (ECM) proti proteolytické degradaci (SASAKI *et al.* 1996). Různé vápník vázající epidermálnímu růstovému faktoru podobné domény (cbEGF) mají rozdílnou afinitu k vápníku, takže nasycení vápníkem se po délce nativního fibrillinu za fyziologického stavu liší (CORSON *et al.* 1993, SMALLRIDGE *et al.* 1999). Odstranění vápníku (inkubací v EDTA) způsobuje narušení mikrofibrilární struktury a roztřepený vzhled fibrilinu (KIELTY a SHUTTLEWORTH 1993).

Gen dále obsahuje také sedm domén, které jsou homologní k latentním proteinům, které vážou transformující růstový faktor – beta (SAHARINEN a KESKI 2000).

6.2. Mutace v genu *FBNI*

Bylo popsáno více než 2900 mutací v genu *FBNI* a z těchto mutací je více než 90 % jedinečných pro jednotlivce či rodinu (ARSLAN – KIRCHNER *et al.* 2010). Jednotlivé mutace jsou ukládány v mezinárodní Marfanově databázi (COLLOD – BEROUD 1998).

Minimálně 25% mutací nastává v důsledku nových mutací v genu pro fibrilin – 1 a objevuje se u pacientů bez rodinné historie tohoto syndromu (GEORGE 2020).

Mutace, které způsobují Marfanův syndrom, se nacházejí v celém rozsahu genu pro fibrillin – 1 (přehled mutací viz obrázek č. 4). Nebyly objeveny žádné „horké skvrny“, ale shlukování mutací v oblasti exonů 24 – 32 je spojeno s nMFS, tedy nejzávažnější formou tohoto syndromu (ROBINSON 2000).

Z počátku byla pro analýzu používána cDNA analýzy genu pro fibrillin – 1 (citlivost detekce mutace byla mezi 10 – 25 %) a mutace byly nalezeny u menšiny pacientů (TYNAN *et al.* 1993, KAINULAINEN *et al.* 1994).

V roce 1995 byl publikován screening všech 65 exonů s mírou detekce 78 % (NIJBROEK *et al.* 1995).

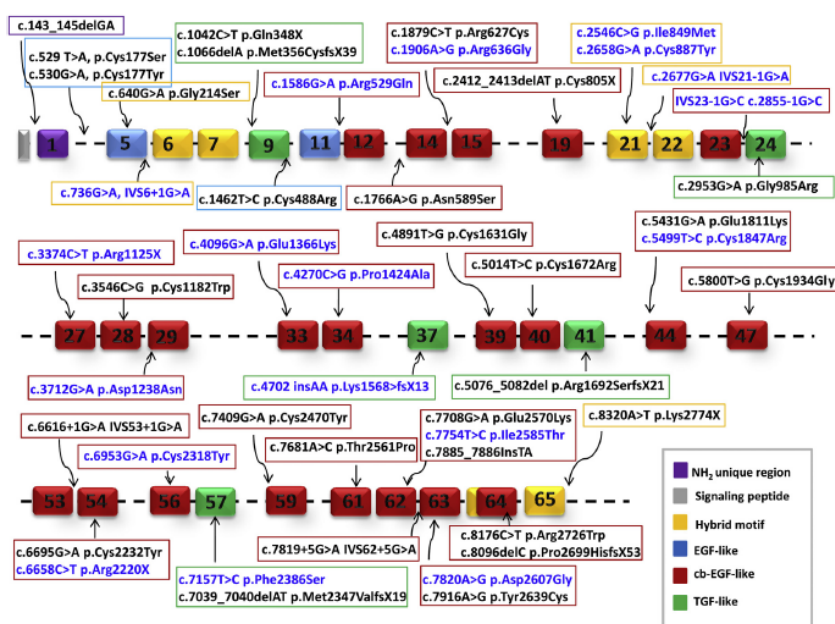
Nejdůležitější faktor, který ovlivňuje míru detekce mutací, je klinická homogenita resp. heterogenita pacientů. Několik studií ukázalo, že výskyt mutací *FBNI* je výrazně vyšší u pacientů, kteří splňují diagnostická kritéria pro MFS. (LOEYS *et al.* 2001)

Z dat zjištěných imunofluorescenčními studiemi z dermálních fibroblastů jedinců s MFS vyplývá, že jsou kvalitativně změněné fibrilinové sítě nebo dochází ke kvantitativnímu snížení jejich počtu (GODFREY *et al.* 1990b, GODFREY *et al.* 1990a, HOLLISTER *et al.* 1990). Tato skutečnost je způsobena mutacemi ve fibrilinu – 1, které vedou k narušení procesu tvorby těchto sítí (MILEWICZ *et al.* 1992). Což bylo potvrzeno studií, která potvrdila zhoršené začlenění mutantního fibrilinu do ECM, což naznačuje funkční poruchy v raných fázích procesu tvorby fibrilinu (AOYAMA *et al.* 1993, BRENN *et al.* 1996).

U nMFS byly detekovány nesmyslné (missense) mutace, delece a mutace, které přeskakují exon v oblasti exonů 31-32 (BOOMS *et al.* 1999). Pacienti, u kterých se vyskytuje mutace s přeskokováním exonu, mají závažný fenotyp. Dochází u nich k radikálnímu narušení tvorby mikrofibril na úrovni monomerů fibrilinu (LIU *et al.* 1996).

Některé mutace mohou postihnout moduly cbEGF, což vede ke snížené vazbě vápníku, která je pak identifikována při MFS (WINSHIP a DRAGON 1991).

Globální analýza mutací *FBNI* vede k rozdělení mutací na dvě třídy. První třída zahrnuje mutace, které představují třetinu objevujících se, a jedná se o mutace vedoucí ke zkrácení vznikajících molekul fibrilinu – 1. Paří sem nesmyslné mutace, chyby sestřihu, duplikace a delece a tím posun čtecího rámce. Druhá třída představuje zhruba dvě třetiny zaznamenaných mutací a patří sem missense mutace (většinou tyto mutace vyskytují v cbEGF – podobných modulech) (ROBINSON *et al.* 2006).



obrázek č. 4: Přehled stavby *FBNI* se zvýrazněnými exony, ve kterých se nachází patologické mutace (modře – nikdy zde nebyly hlášeny mutace, černě – v těchto oblastech mutace hlášeny byly) (převzato z DECARIO *et al.* 2018).

Mutace v tomto genu mohou také vést k tzv. syndromu ztuhlé kůže, a to pokud se mutace nachází v oblasti exonu 37. Vyskytnout se může také velmi vzácné onemocnění akromikrická dysplazie (mutace exonů 41 – 42), a také Shprintzen – Goldbergův syndrom kraniosyostózy, pokud se jedná o exon 29 (FAIVRE *et al.* 2009, KOSAKI *et al.* 2006, LE GOFF *et al.* 2011, LOEYS *et al.* 2010).

6.2.1. Mutace způsobující záměny cysteinu

V *FBNI* je přítomno více než 360 cysteinů. Jeho obsah je důležitý pro tvorbu disulfidických můstků. Pokud dochází k mutaci, jedná se o missense mutace, kdy cystein nahrazen jinou aminokyselinou či jiná aminokyselina nahrazena cysteinem, nebo kdy je cystein zaveden do nové polohy. Substituce cysteinu je nejčastější mutace u pacientů s MFS (JUDGE *et al.* 2004) a většina z nich zahrnuje vápník vázající epidermálnímu růstovému faktoru – podobné

domény (AOYAMA *et al.* 1994), které jsou vysoce konzervované (obsahují 6 cysteinových aminokyselin, které tvoří disulfidické můstky) (ADES *et al.* 1996).

6.2.2. Mutace způsobující záměnu jiných aminokyselin než cysteinu

Jedná se o skupinu mutací, kdy je aminokyselina nahrazena jinou, ale nejedná se o cystein. Tato skupina se výrazně neliší od první skupiny, ale tyto mutace mohou způsobovat jisté zajímavé odchylky v postižení kardiovaskulárního systému (viz níže) (FRANKEN *et al.* 2014).

Missense mutace jsou příčinou dominantně negativního efektu, který vede k narušení skládání fibrillinu – 1, nebo jeho interakcí (FRANKEN *et al.* 2014).

6.2.3. Intronové mutace

Do této skupiny patří i další mutace, které vedou k minor in – frame delecí (mutaci způsobující chybění aminokyseliny v polypeptidovém řetězci) nebo inzerci (mutaci způsobující vložení aminokyseliny do polypeptidového řetězce) (GILLIS *et al.* 2014).

U pacientů, u kterých nebyla nalezena příčina výskytu MFS, byla jako možnost navržena přítomnost intronových mutací. Tyto mutace se vyskytují u 8 % pacientů a mohou způsobit částečnou delecí exonu nebo částečnou inzerci intronu (GILLIS *et al.* 2014).

6.2.4. Delece celého genu, exonu 1 nebo exonu 65

Delece celého genu vede k „haploinsuficienci“, tedy sníženému množství normálního FBN1 proteinu. V myším modelu, kdy je alela *FBNI* vydeletována, dochází k uvolnění nadměrného množství TGF-beta proteinu, což může být příčinou klinických projevů MFS v tomto modelu (NEPTUNE *et al.* 2003). Zda se jedná o příčinu i u lidských pacientů zatím není potvrzeno. Haploinsuficience u těchto pacientů však vede k množství projevů MFS (od mírných po těžké) (FRANKEN *et al.* 2014).

Protein FBN1 také nevzniká, pokud dochází k delecí prvního exonu. Pokud dojde k delecí posledního exonu (exonu 65) vznikne abnormální protein (chybí terminační kodon), který je následně degradován (FRANKEN *et al.* 2014).

6.2.5. Předčasné zařazení terminačního kodonu

V databázi mutací MFS se předčasné zařazení terminačního kodonu (PTC) vyskytuje u 29 % pacientů. Příčinou PTC bývá missense mutace, mutace v důsledku posunutí čtecího rámce, či intronové mutace (SCHRIJVER *et al.* 2002).

6.2.6. Dvě různé mutace v genu *FBN1*, projevy u recesivních homozygotů

MFS se zřídka dědí recesivně, poprvé byl tento typ dědičnosti potvrzen v roce 2007. U heterozygotů se vyskytovaly pouze mírné příznaky MFS (DE VRIES *et al.* 2007). V jiné rodině, kde byla tato dědičnost také pozorována, se u heterozygotů žádné projevy nevyskytovaly a homozygot má klasický fenotyp MFS (HILHORST-HOFSTEE *et al.* 2010).

Pokud se u pacienta vyskytnou dvě různé mutace způsobující MFS, klinické projevy jsou obecně vážnější (ARBUSTINI *et al.* 2005).

6.3. Gen *FBN2*

Tento gen je vysoce homologní s genem pro fibrillin1 (ROBINSON 2000). Struktura domén i počet a pořadí strukturních motivů jsou u proteinů identické. Jsou zde však významné rozdíly mezi fibrilinem – 1 a 2. Fibrilin – 1 obsahuje jeden motiv RGD, a mnoho prolinů, fibrilin – 2 obsahuje 2 motivy RGD a je bohatý na glycinové zbytky. Tyto rozdíly odrážejí jejich různé role (ZHANG *et al.* 1994). *FBN2* je exprimován dříve, jeho transkripty se hromadí před tkáňovou diferenciací. Po ní se naopak zvyšuje množství transkriptů *FBN1* (ZHANG *et al.* 1995). Fibrilin 1 je tedy exprimován od období gastruly po celý dospělý život (GALLAGHER *et al.* 1993). Další rozdíl je také ve výskytu fibrilinu – 1 a 2. Fibrilin – 2 se vyskytuje hlavně v elastických tkáních (elastické chrupavky, tunica media aorty apod.) Fibrilin – 1 oproti tomu převažuje v strukturách, které odolávají napětí, jako je například zonula ciliaris, aortální adventicie, apod. (ZHANG *et al.* 1995). Mutace v tomto genu způsobují kontrakční arachnodaktylii, což je porucha, která fenotypově souvisí s MFS (ROBINSON 2000).

6.4. Geny *TGFBR1* a *TGFBR2*

Mutace v genech *TGFBR1* a 2 byly nalezeny u pacientů s poruchami s různým stupněm překryvu s klasickým MFS (LOEYS *et al.* 2005) a všeobecně se často účastní patogeneze četných poruch pojivové tkáně (VERSTRAETEN *et al.* 2016). U pacientů s kosterními projevy shodnými jako u MFS byly popsány mutace v genu pro *TGFBR2* (MIZUGUCHI *et al.* 2004). Mutace v *TGFBR1* a 2 byly také prokázány u pacientů s hrudním aortálním aneurysmatem (TAA) a Loeys – Dietzovým syndromem (LDS) (LOEYS *et al.* 2005).

Lze tedy předpokládat, že změny v regulaci TGF – beta signalizace se mohou obecně vzato podílet na tvorbě aneurysmatu (BAAS *et al.* 2010) a fungovat jako modulátory závažnosti postižení kardiovaskulárního systému u pacientů s MFS.

Mutace *TGFBR1* a *TGFBR2* pravděpodobně nejsou majoritním genetickým determinantem pro MFS. Z údajů, které byly získány, ale nelze vyloučit roli změněné signalizace TGF – beta (RUDDY *et al.* 2013). Není však jasné, zda za rozvojem hrudního aortálního aneurysmatu u poruch pojivové tkáně stojí snížená či zvýšená aktivace této signalizace. K rozvoji TAA může dojít při inaktivaci genů jak pro pozitivní, tak i pro negativní efekty této dráhy. (GALLO *et al.* 2014, DECARIO *et al.* 2018).

6.5. Latentní transformující růstový faktor – beta vázající protein (LTBP)

Geny, které kódují LTBP, lze považovat za kandidátní pro mnoho poruch, které se překrývají s MFS. Geny kódující fibriliny jsou totiž strukturně příbuzné této genové rodině – dosud nalezené geny také obsahují tandemové kopie motivu cbEGF a opakování motivu 8 – Cys (viz předchozí kapitola) (SAHARINEN *et al.* 1996, GLEIZES *et al.* 1996). LTBP interaguje s ECM a TGF – beta (MIYAZONO *et al.* 1991, HORI *et al.* 1998). Kvůli této interakci (která je blíže popsána v kapitole 5) lze geny pro LTBP považovat za kandidátní pro mnoho mikrofibrilinopatií i MFS.

6.6. Fenotypové projevy – korelace mezi genotypem/fenotypem

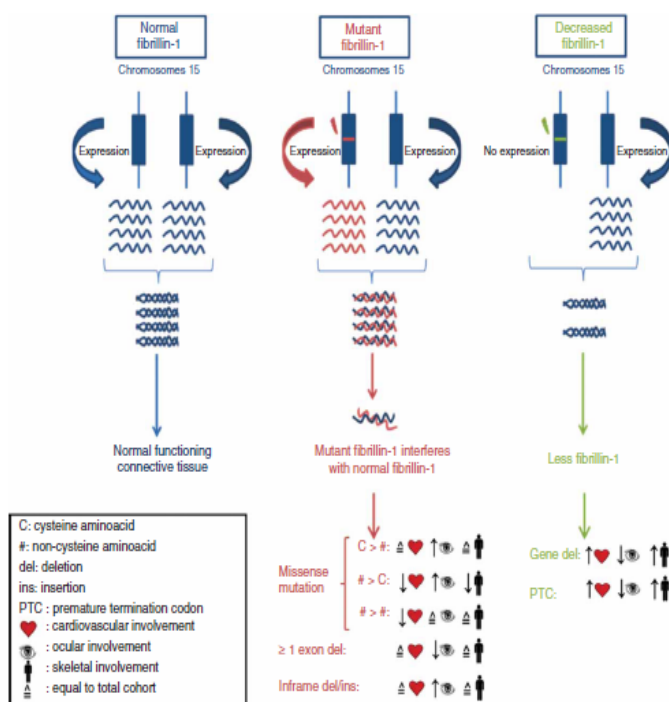
Ve fenotypových projevech lze nalézt značnou intrafamiliární variabilitu. Tato skutečnost naznačuje, že velký vliv má i prostředí či modifikující geny (HUTCHINSON *et al.* 2003). I přes značnou intrafamiliární variabilitu byly nalezeny některé korelace mezi genotypem a fenotypem. Tyto korelace jsou uvedeny níže. Celkově je ale fenotypový projev velmi variabilní a znalost specifické mutace *FBNI* je málo prognostická (LOEYS *et al.* 2010).

Obecný přehled různých mutačních důsledků je k dispozici ve shrnujícím obrázku (obrázek č. 5).

Bylo potvrzeno, že existuje zvýšená prevalence ektopie čočky (ectopia lentis) mezi pacienty s cysteinovými mutacemi.

Pokud dochází k missense mutaci, většinou se vyskytuje v cbEGF modulech (78 %). Dochází pak k záměně aminokyselin účastnících se vazby vápníku, nebo cysteinových zbytků.

Aby došlo k správnému skládání cbEGF musí být přítomny tři disulfidické vazby. Pokud chybí nebo je přidán cystein, může dojít k nesprávnému složení. Může se pak objevit zpožděná sekrece či zvýšená proteázová citlivost. Fenotypově vede substituce cysteinu k signifikantně vyššímu výskytu ektopie čočky (BOILEAU *et al.* 2005).



obrázek č. 5: Přehled důsledků různých typů mutací *FBN1* a jejich projevů (missense mutace, mutace přeskakující exon a in – frame inzerce nebo delece vedou k mutantnímu fibrilinu; delece celého genu a předčasné zařazení terminačního kodonu vede k snížené produkci fibrilinu – 1) (převzato z FRANKEN *et al.* 2014).

U pacientů s non – cysteinovými missense mutacemi se objevuje závažnější postižení kardiovaskulárního a kosterního systému. Aneuryzmata se objevují u 65 % (vs 52 %, $p = 0,01$) pacientů, prolaps mitrální chlopně u 44 % (vs 27 %, $p = 0,023$), postižení kostry se vyskytuje dokonce u 86 % (vs 63 %, $p < 0,001$) (BOILEAU *et al.* 2005).

Pacienti s in – frame delecí nebo inzercí vykazují vážnější postižení očního systému proti pacientům s delecí alespoň jednoho exonu (85 vs 49 %, $p = 0,003$). V projevech v kardiovaskulárním systému se tito pacienti neliší (BOILEAU *et al.* 2005).

V případě pacienta s delecí exonu 65 byly zaznamenány oční a kosterní příznaky, ale neobjevily se kardiovaskulární. Pokud je deletován celý gen prevalence ectopia lentis je významně nižší. (28 % vs 52 %, $p = 0,006$), ale kosterní příznaky se vyskytují výrazně častěji (100 % vs 84 %, $p = 0,049$) (BOILEAU *et al.* 2005).

Haploinsuficience vede k vysoké prevalenci kardiovaskulárního postižení a ke 100% zapojení kosterního systému (BOILEAU *et al.* 2005).

Pokud u pacientů s MFS dochází k PTC, často je postižen kosterní systém (82 vs 65 %, $p < 0,001$), ale méně často se objevuje ectopia lentis (29 vs 41 %, $p < 0,001$), což může být důležité při diagnostice MFS, která může být nepřítomností tohoto projevu opožděna. U těchto pacientů se fenotyp celkově podobá fenotypu pacientů s genovou delecí, protože mutované transkripty se rychle rozpadají (FRANKEN *et al.* 2014). Závažnost postižení je dána množstvím mutantního transkriptu mRNA a procentem zkrácených proteinů zabudovávaných do mikrofibril (BOILEAU *et al.* 2005).

Jako genetický modifikátor byla také prokázána zvýšená hladina homocysteinu, která může narušovat můstky cystein – cystein. Tento jev má souvislost se závažností kardiovaskulárních projevů (BOILEAU *et al.* 2005).

Klinické projevy se vývojově liší, a tyto rozdíly mohou být způsobeny mutačním účinkem na úrovni proteinu. I u těchto pacientů se ale liší fenotyp – ectopia lentis se vyskytuje častěji u cysteinové missense mutace, ne u missense mutace (JUDGE *et al.* 2004).

U pacientů s nMFS se vyskytuje nejčastěji mutace v exonech 24 – 32. Lze však najít pacienty s mutací v této oblasti, kteří vykazují mírné či klasické příznaky (FAIVRE *et al.* 2009).

7. Diskuze

Problematika týkající se Marfanova syndromu je rozsáhlé téma. Při tvorbě této bakalářské práce jsem se zaměřila především na genetickou a molekulárně biologickou podstatu tohoto syndromu. Abych dostatečně pochopila všechny souvislosti, musela jsem se seznámit i s projevem MFS a diagnostikou tohoto syndromu.

MFS byl poprvé popsán v roce 1896 Antionem-Bernardem Marfanem – francouzským pediatrem. Nejvíce studií, které se týkají MFS, bylo vytvořeno a publikováno v 90. letech. V této době vyšlo velké množství článků, obsahující především základní informace, týkající se uložení genu *FBNI*, jeho sekvence, popisů projevů tohoto syndromu. Po objevení genu, který je majoritním původcem MFS, byl tento poznatek použit při diagnostice a rozlišení MFS a dalších fibrilinopatií (poruch postihující syntézu fibrilin). Mezi hlavní autory literárních zdrojů této doby patří v oblasti týkající se uložení genu *FBNI*, popisu fibrilinu a základních příznaků MFS například Dietz, Gott, Sakai či Reinhardt (DIETZ 1991, GOTT 1998, SAKAI *et al.* 1986, REINHARDT *et al.* 1996). Dalšími autory, kteří se zaměřují především na příznaky a diagnostiku Marfanova syndromu, jsou Pyeritz, Gray a Davies (PYERITZ 1993, GRAY a DAVIES 1996).

V současné době jsou publikovány práce, které zpřesňují informace týkající se MFS, a dochází k získávání nových poznatků hlavně díky pokrokům ve výzkumných genetických metodách. Výzkum je zaměřen zejména na hledání mutací, které způsobují Marfanův syndrom či přidružené poruchy. Významnými literárními autory v současné době jsou v této oblasti výzkumu například Franken, Boileau, Robinson (FRANKEN *et al.* 2014, BOILEAU *et al.* 2005, ROBINSON 2000, DECARIO *et al.* 2018, BENARROCH *et al.* 2019, STRANGER *et al.* 2019).

V této kapitole bych se ještě chtěla zamyslet nad využitím tématu Marfanova syndromu ve výuce. Toto téma, ačkoliv je poměrně složité a odborné, by se dle mého názoru dalo dobře využít ve výuce, konkrétně ve výuce biologie na středních školách či gymnáziích (samozřejmě s příslušným zjednodušením, či úpravami rozsahu). Myslím, že zahrnutí konkrétních onemocnění a případových studií do výuky genetiky člověka by pro žáky bylo zajímavým oživením a mělo by i motivační účinky. Uvedení zajímavých a konkrétních poznatků z této oblasti žáky motivuje k samostudiu, či prohlubování znalostí v této tematické oblasti, vede je k hlubšímu pochopení genetických principů.

Konkrétně Marfanův syndrom je dobře zařaditelný a využitelný při výkladu. Lze ho zahrnout při výkladu a vysvětlení pojmu „syndrom“. Zároveň splňuje, v současné době vyhledávané, kritérium pro mezipředmětové vztahy – lze ho provázat s uměleckou výchovou či dějepisem (v souvislosti s některými umělecky i historicky významnými osobnostmi, u kterých byl MFS popsán), což může zaujmout i žáky, kteří nejsou příliš přírodovědně zaměřeni. Propojení může být zprostředkováno například projektovou výukou na téma syndromů, ve které se lze zaměřit na zkoumání tohoto tématu z různých pohledů - například vývoj historického vnímání pacientů postižených syndromy, známé osobnosti postižené syndromy, apod. Zároveň lze zaměřením se na toto téma žáky naučit citlivému přístupu k pacientům postiženým například právě některými syndromy a zlepšovat tak jejich sociální dovednosti.

Je možné toto téma také využít ve výuce kapitoly o metodách genetického výzkumu a na konkrétním případě uvést, jak probíhá genetické mapování, a jak to může být složitý a časově náročný proces. Jak už bylo uvedeno, konkrétní případ pak žákům tuto tematiku lépe přiblíží a bude pro ně lépe představitelná než abstraktní obecné pojmy.

Ačkoliv je Marfanův syndrom poměrně široké a náročné téma je využitelný ve výuce mnoha způsoby, z nichž některé jsem uvedla v této diskuzi (viz výše).

8. Závěr

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zmapovat literární znalosti o Marfanově syndromu v oblasti genetiky. Konkrétně o způsobech dědičnosti, genetickém mapování při výzkumu tohoto tématu, a zaměřit se na molekulární genetické příčiny vzniku tohoto onemocnění. Tento cíl se podařilo splnit. Úskalí, která se týkají mapování literárních znalostí, se zaměřením na existenci především zahraničních zdrojů, jsou uvedena v diskuzi.

Další kapitoly této bakalářské práce týkající se diagnostiky a projevů MFS pak naplňují další stanovený cíl, tedy tyto popsat a zaměřit se nově i dříve používané diagnostické metody, shrnout projevy a patogenezi tohoto onemocnění, k čemuž bylo využito i případových studií.

Využití poznatků, které se týkají Marfanova syndromu ve výuce genetiky, bylo nastíněno v kapitole Diskuze. Toto nastínění jistě nepokrývá celou škálu možného využití tohoto komplexního tématu ve výuce, může ale být vodítkem, jak ho zařadit a využít ve výuce genetiky na středních školách či gymnáziích. Dále také nabízí několik možností, jakým způsobem s tímto poměrně složitým genetickým tématem pracovat a využít ho v mezipředmětových vztazích.

9. Přehled literatury

Ades, L.C., Haan, E.A., Colley, A.F., Richard, R.I. (1996): Characterisation of four novel fibrillin-1 (FBN1) mutations in Marfan syndrome. *J Med Genet* 33(8):665-71.

Aoyama, T., Tynan, K., Dietz, H. C., Francke, U., Furthmayr, H. (1993): Missense mutations impair intracellular processing of fibrillin and microfibril assembly in Marfan syndrome. *Human Molecular Genetics*, 2(12), 2135–2140. doi:10.1093/hmg/2.12.2135.

Aoyama, T., Francke, U., Dietz, H.C., Furthmayr, H. (1994): Quantitative differences in biosynthesis and extracellular deposition of fibrillin in cultured fibroblasts distinguish five groups of Marfan syndrome patients and suggest distinct pathogenetic mechanisms. *J Clin Invest* 94(1):130–7.

Arbustini, E., Grasso, M., Ansaldi, S., Malattia, C., Pilotto, A., Porcu, E., Disabella E, Marziliano N, Pisani A, Lanzarini L, Mannarino S, Larizza D, Mosconi M, Antoniazzi E, Zoia MC, Meloni G, Magrassi L, Brega A, Bedeschi MF, Torrente I, Mari F, Tavazzi, L. (2005): Identification of sixty-two novel and twelve known FBN1 mutations in eighty-one unrelated probands with Marfan syndrome and other fibrillinopathies. *Human Mutation*, 26(5), 494–494. doi:10.1002/humu.9377.

Arslan – Kirchner, M., Arbustini, E., Boileau, C., Child, A., Collod-Beroud, G., De Paepe, A., Epplen J, Jondeau G, Loeys B Faivre, L. (2010): Clinical utility gene card for: Marfan syndrome type 1 and related phenotypes [FBN1]. *European Journal of Human Genetics*, 18(9). doi:10.1038/ejhg.2010.42.

Baas, A.F., Medic, J., van 't Slot, R., de Kovel, C.G., Zhernakova, A., Geelkerken, R.H., Kranendonk, S.E., van Sterkenburg, S.M., Grobbee, D.E., Boll, A.P., Wijmenga, C., Blankensteijn, J.D., Ruigrok, Y.M. (2010): Association of the TGF-beta receptor genes with abdominal aortic aneurysm. *Eur J Hum Genet*: 18:240-4.

Benarroch, L., Aubart, M., Gross, M.-S., Arnaud, P., Hanna, N., Jondeau, G., Boileau, C. (2019): Reference Expression Profile of Three FBN1 Transcript Isoforms and Their Association with Clinical Variability in Marfan Syndrome. *Genes* 10(2), 128. doi:10.3390/genes10020128

Biery, N.J., Eldadah, Z.A., Moore, C.S., Stetten, G., Spencer, F., Dietz, H.C. (1999): Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics* **56**: 70-7.

Boileau, C., Jondeau G., Babron, M.C., Coulon, M., Alexandre, J.A., Sakai, L., Melki, J., Delome, G., Dubourg, O., Bonaïti-Pellié, C., Bourdarias, J.P., Junien, C. (1993): Autosomal dominant Marfan-like connective-tissue disorder with aortic dilation and skeletal anomalies not linked to the fibrillin genes. *Am J Hum Genet* **53**:46-54.

Boileau, C., Jondeau, G., Mizuguchi, T., Matsumoto, N. (2005): Molecular genetics of Marfan syndrome. *Current Opinion in Cardiology*, 20(3), 194–200. doi:10.1097/01.hco.0000162398.21972.cd.

Booms, P., Cisler, J., Mathews, K. R., Godfrey, M., Tiecke, F., Kaufmann, U. C., Hagemeyer, Ch., Robinson, P. N. (1999): Novel exon skipping mutation in the fibrillin-1 gene: Two “hot spots” for the neonatal Marfan syndrome. *Clinical Genetics* 55(2), 110–117. doi:10.1034/j.1399-0004.1999.550207.x.

Brenn, T., Aoyama, T., Francke, U., Furthmayr, H. (1996): Dermal fibroblast culture as a model system for studies of fibrillin assembly and pathogenetic mechanisms: defects in distinct groups of individuals with Marfan's syndrome. *Lab Invest* 75(3):389–402.

- Buntinx, I. M., Willems, P. J., Spitaels, S. E., Van Reempst, P. J., De Paepe, A. M., Dumon, J. E. (1991): Neonatal Marfan syndrome with congenital arachnodactyly, flexion contractures, and severe cardiac valve insufficiency. *Journal of Medical Genetics* 28(4), 267–273. doi:10.1136/jmg.28.4.267.
- Cistulli, P.A., Gotsopoulos, H., Sullivan, C.E. (2001): Relationship between Craniofacial abnormalities and sleep-disordered breathing in Marfan's syndrome. *Chest* 120: 1455–1460.
- Collod, G., Babron, M.-C., Jondeau, G., Coulon, M., Weissenbach, J., Dubourg, O., Bourdarias J.P., Bonaïti-Pellié C., Junien C., Boileau, C. (1994): A second locus for Marfan syndrome maps to chromosome 3p24.2–p25. *Nature Genetics* 8(3), 264–268. doi:10.1038/ng1194-264.
- Cury, M., Zeidan, F., Lobato, A. C. (2013): Aortic Disease in the Young: Genetic Aneurysm Syndromes, Connective Tissue Disorders, and Familial Aortic Aneurysms and Dissections. *International Journal of Vascular Medicine* 1–7. doi:10.1155/2013/267215.
- Collod-Beroud, G. (1998): Marfan Database (third edition): new mutations and new routines for the software. *Nucleic Acids Research* 26(1), 229–233. doi:10.1093/nar/26.1.229.
- Corson, G.M., Chalberg, S.C., Dietz, H.C., Charbonneau, N.L., Sakai, L.Y. (1993): Fibrillin binds calcium and is coded by cDNAs that reveal a multidomain structure and alternatively spliced exons at the 5' end. *Genomics* 17:476-84.
- Cross, H.E., Jensen, A.D. (1973): Ocular manifestations in the Marfan syndrome and homocystinuria. *Am J Ophthalmol* 75: 405-20.
- Dallas, S.L., Miyazono, K., Skerry, T.M., Mundy, G.R., Bonewald, L.F. (1995): Dual role for the latent transforming growth factor- α binding protein in storage of latent TGF- α in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J Cell Biol* 131:539-49.
- Dean, J. C. S. (2007): Marfan syndrome: clinical diagnosis and management. *European Journal of Human Genetics* 15(7), 724–733. doi:10.1038/sj.ejhg.5201851.
- De Carlo, R., Sticchi, E., Lucarini, L., Attanasio, M., Nistri, S., Marcucci, R., Pepe G, Giusti, B. (2018): Role of TGFBR1 and TGFBR2 genetic variants in Marfan syndrome. *Journal of Vascular Surgery* 68(1), 225–233.e5. doi:10.1016/j.jvs.2017.04.071.
- De Paepe, A., Devereux, R.B., Dietz, H.C., Hennekam, R.C., Pyeritz, R.E. (1996): Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet* 62: 417–426.
- Desai, N.D., Pochettino, A., Szeto, W.Y., Moser, W., Moeller, P.J., Sodhi, N., Jackson, B., Woo, E., Fairman, R.M., Bavaria, J. (2011): Thoracic endovascular aortic repair: evolution of therapy, patterns of use, and results in a 10-year experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 142:587–94.
- Dietz, H. C., Cutting, C. R., Pyeritz, R. E., Maslen, C. L., Sakai, L. Y., Corson, G. M, Puffenberger E.G., Hamosh A., Nathakumar E.J., Curristin S.M., Stetten G., Meyers D.A., Francomano, C. A. (1991): Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352(6333), 337–339. doi:10.1038/352337a0.
- Dietz, H., Francke, U., Furthmayr, H., Francomano, C., Paepe, A. D., Devereux, R., Ramirez, F., Pyeritz, R. (1995): The question of heterogeneity in Marfan syndrome. *Nature Genetics* 9(3), 228–229. doi:10.1038/ng0395-228 .
- Downing, A., Knott, V., Werner, J., Cardy, C., Campbell, I., & Handford, P. (1996): Solution Structure of a Pair of Calcium-Binding Epidermal Growth Factor-like Domains: Implications for the

Marfan Syndrome and Other Genetic Disorders. *Cell* 85(4), 597–605. doi:10.1016/s0092-8674(00)81259-3

Eldadah, Z. A., Brenn, T., Furthmayr, H., Dietz, H.C. (1995): Expression of a mutant human fibrillin allele upon a normal human or murine genetic background recapitulates a Marfan cellular phenotype. *Journal of Clinical Investigation* 95(2), 874-880. doi: 10.1172/JCI117737.

Faivre, L., Collod-Beroud, G., Callewaert, B., Child, A., Binquet, C., Gautier, E., Loeys, B.L., Arbustini, E., Mayer, K., Arslan-Kirchner, M., Stheneur, C., Kiotsekoglou, A., Comeglio, P., Marziliano, N., Wolf, J.E., Bouchot, O., Khau-Van-Kien, P., Beroud, C., Claustres, M., Bonithon-Kopp, C., Robinson, P.N., Adès, L., De Backer, J., Coucke, P., Francke, U., De Paepe, A., Jondeau, G., Boileau, C. (2009): Clinical and mutation-type analysis from an international series of 198 probands with a pathogenic FBN1 exons 24-32 mutation. *Eur J Hum Gene* 17(4):491-501.

Faivre, L., Collod-Beroud, G., Adès, L., Arbustini, E., Child, A., Callewaert, B.L., Loeys, B., Binquet, C., Gautier, E., Mayer, K., Arslan-Kirchner, M., Grasso, M., Beroud, C., Hamroun, D., Bonithon-Kopp, C., Plauchu, H., Robinson, P.N., De Backer, J., Coucke, P., Francke, U., Bouchot, O., Wolf, J.E., Stheneur, C., Hanna, N., Detaint, D., De Paepe A., Boileau, C., Jondeau, G. (2012): The new Ghent criteria for Marfan syndrome: what do they change? *Clin Genet* 81: 433–442.

Franken, R., Heesterbeek, T. J., de Waard, V., Zwinderman, A. H., Pals, G., Mulder, B. J., & Groenink, M. (2014): Diagnosis and genetics of Marfan syndrome. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 2(10), 1049–1062. doi:10.1517/21678707.2014.950223

Gallagher, B.C., Sakai, L.Y., Little, C.D. (1993): Fibrillin delineates the primary axis of the early avian embryo. *Dev Dyn* 196(1):70–8.

Gallo, E.M., Loch, D.C., Habashi, J.P., Calderon, J.F., Chen, Y., Bedja, D., van Erp, C., Gerber, E.E., Parker, S.J., Sauls, K., Judge, D.P., Cooke, S.K., Lindsay, M.E., Rouf, R., Myers, L., ap Rhys, C.M., Kent, K.C., Norris, R.A., Huso, D.L., Dietz, H.C. (2014): Angiotensin II-dependent TGF- β signaling contributes to Loeys-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J Clin Invest* 124:448-60.

George, M. (2020) : Marfan Syndrome. *J Microbiol Genet* 05: 123. DOI: 10.29011/2574-7371.100023.

Gibson, M.A., Sandberg, L.B., Grosso, L.E., Cleary, E.G. (1991): Complementary DNA cloning establishes microfibril-associated glycoprotein (MAGP) to be a discrete component of the elastin-associated microfibrils. *J Biol Chem* 266:7596-601.

Gibson, M.A., Hatzinikolas, G., Kumaratilake, J.S., Sandberg, L.B., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Cleary, E.G. (1996): Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MP25). *J Biol Chem* 271:1096-103.

Gillis, E., Kempers, M., Saleminck, S., Timmermans, J., Cheriex, E. C., Bekkers, S. C. A. M., Fransen E, De Die – Smulders CE, Loyes BL, Laer, L. V. (2014): AnFBN1Deep Intronic Mutation in a Familial Case of Marfan Syndrome: An Explanation for Genetically Unsolved Cases? *Human Mutation*, 35(5), 571–574. doi:10.1002/humu.22540 .

Giusti, B., Nistri, S., Sticchi, E., De Cario, R., Abbate, R., Gensini, G.F., Pepe, G. (2016): A case based approach to clinical genetics of thoracic aortic aneurysm/dissection. *Biomed Res Int* 2016: 9579654.

Gleizes, P.E., Beavis, R.C., Mazzieri, R., Shen, B., Rifkin, D.B. (1996): Identification and characterization of an eight-cysteine repeat of the latent transforming growth factor- β binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor- β 1. *J Biol Chem* 271:29891-6.

Gott VL. (1998): Antoine Marfan and his syndrome: one hundred years later. *Maryland Medical Journal* (Baltimore, Md. : 1985). 47(5):247-252.

Gray, J.R., Bridges, A.B., Faed, M.J., Pringle, T., Baines, P., Dean, J., Boxer, M. (1994): Ascertainment and severity of Marfan syndrome in a Scottish population. *J Med Genet* 31:51-54.

Grahame, R., Pyeritz, R.E. (1995) : The Marfan syndrome: joint and skin manifestations are prevalent and correlated. *Br J Rheumatol* 34: 126–131.

Gray, J.R., Davies, S.J. (1996): Marfan syndrome. *J Med Genet* 33:403-8.

Gray, J.R., Bridges, A.B., West, R.R., McLeish, L., Stuart, A.G., Dean, J.C., Porteous, M.E., Boxer, M., Davies, S.J. (1998): Life expectancy in British Marfan syndrome populations. *Clin Genet* 54: 124–128.

Godfrey, M., Menashe, V., Weleber, R.G., Koler, R.D., Bigley, R.H., Lovrien, E., Zonana, J., Hollister, D.W. (1990a): Cosegregation of elastin-associated microfibrillar abnormalities with the Marfan phenotype in families. *Am J Hum Genet* 46(4):652–60.

Godfrey, M., Olson, S., Burgio, R.G., Martini, A., Valli, M., Cetta, G., Hori, H., Hollister, D.W. (1990b): Unilateral microfibrillar abnormalities in a case of asymmetric Marfan syndrome. *Am J Hum Genet* 46(4):661–71.

Godfrey, M., Raghunath, M., Cisler, J., Bevins, C.L., DePaepe, A., Di Rocco, M., Gregoritch, Imaizumi, K., Kaplan, P., Kuroki, Y., Silberbach, M., Supeti – Furga, A., Van Thienen, M.N., Vetter, U., Sterinmann, B. (1995): Abnormal morphology of fibrillin microfibrils in fibroblast cultures from patients with neonatal Marfan syndrome. *Am J Pathol* 146:1414-21.

Groenink, M., Lohuis, T.A.J., Tijssen, J.G., Naeff, M.S., Hennekam, R.C., van der Wall, E.E., Mulder, B.J. (1999): Survival and complication free survival in Marfan's syndrome: implications of current guidelines. *Heart* 82: 499–504.

Groeneveld, M. E., Bogunovic, N., Musters, R. J. P., Tangelder, G. J., Pals, G., Wisselink, W., Micha D, Yeung, K. K. (2018): Betaglycan (TGFB3) up-regulation correlates with increased TGF- β signaling in Marfan patient fibroblasts in vitro. *Cardiovascular Pathology*, 32, 44–49. doi:10.1016/j.carpath.2017.10.003

Hansen, C.J., Bui, H., Donayre, C.E., Aziz, I., Kim, B., Kopchok, G., Walot, I., Lee, J., Lippmann, M., White, R.A. (2004): Complications of endovascular repair of high-risk and emergent descending thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Vasc Surg*. 40:228–34.

Hall, J.R., Pyeritz, R.E., Dudgeon, D.L., Haller, J.A. (1984): Pneumothorax in the Marfan syndrome: prevalence and therapy. *Ann Thorac Surg* 37: 500–504.

Haynes, S.L., Shuttleworth, C.A., Kielty, C.M. (1997): Keratinocytes express fibrillin and assemble microfibrils: implications for dermal matrix organization. *Br J Dermatol* 137:17-23.

Hilhorst-Hofstee, Y., Rijlaarsdam, M. E., Scholte, A. J., Swart-van den Berg, M., Versteegh, M. I., van der Schoot-van Velzen, I., Schäbitz HJ, Bijlsma EK, Baars MJ, Kerstjens-Frederikse WS, Giltay JC, Hamel BC, Breuning MH, Pals, G. (2010): The clinical spectrum of missense mutations of the first aspartic acid of cbEGF-like domains in fibrillin-1 including a recessive family. *Human Mutation*, 31(12), E1915–E1927. doi:10.1002/humu.21372.

- Hoffjan, S. (2012): Genetic Dissection of Marfan Syndrome and Related Connective Tissue Disorders: An Update 2012. *Molecular Syndromology*. doi:10.1159/000339441.
- Hollister, D.W., Godfrey, M., Sakai, L.Y., Pyeritz, R.E. (1990): Immunohistologic abnormalities of the microfibrillar-fiber system in the Marfan syndrome. *N Engl J Med* **323**:152-9.
- Hori, Y., Katoh, T., Hirakata, M., Joki, N., Fukagawa, M., Okuda, T., Ohashi, H., Fujita, T., Miyazono, K., Kurokawa, K. (1998): Anti-latent TGF- β binding protein-1 antibody or synthetic oligopeptides inhibit extracellular matrix expression induced by stretch in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* **53**:1616-25.
- Hubmacher, D., Reinhardt, D. P. (2010): Microfibrils and Fibrillin. *The Extracellular Matrix: An Overview*, 233–265. doi:10.1007/978-3-642-16555-9_7
- Hutchinson, S., Furger, A., Halliday, D., Judge, D.P., Jefferson, A., Dietz, H.C., Firth, H., Handford, P.A. (2003): Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: a potential modifier of phenotype? *Hum Mol Genet* **12**(18):2269–76.
- Hynes, R.O. (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**:11-25.
- Choi, W-I. (2014): Pneumothorax. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* **76**(3): 99–104.
- Jones, J.A., Spinale, F.G., Ikonomidis, J.S. (2009): Transforming growth factor-beta signaling in thoracic aortic aneurysm development: a paradox in pathogenesis. *J Vasc Res* **46**:119-37.
- Judge, D.P., Biery, N.J., Keene, D.R., Geubtner, J., Myers, L., Huso, D.L., Sakai, L.Y., Dietz, D.C. (2004): Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest* **114**(2):172-81
- Kainulainen, K., Karttunen, L., Puhakka, L., Sakai, L., Peltonen, L. (1994): Mutations in the fibrillin gene responsible for dominant ectopia lentis and neonatal Marfan syndrome. *Nat Genet* **6**:64-9.
- Katzke, S., Booms, P., Tiecke, F., Palz, M., Pletschacher, A., Turkmen, S., Neumann, L.M., Pregla, R., Leitner, C., Schramm, C., Lorenz, P., Hagemeier, C., Fuchs, J., Skovby, F., Rosenberg, T., Robinson, P.N. (2002): TGGE screening of the entire FBN1 coding sequence in 126 individuals with marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Hum Mutat* **20**(3):197–208.
- Keene, D.R., Maddox, B.K., Kuo, H.J., Sakai, L.Y., Glanville, R.W. (1991): Extraction of extendable beaded structures and their identification as fibrillin-containing extracellular matrix microfibrils. *J Histochem Cytochem* **39**:441-9.
- Kielty CM, Shuttleworth CA. (1993): The role of calcium in the organization of fibrillin microfibrils. *FEBS Lett* **336**:
- Kosaki, K., Takahashi, D., Udaka, T., Kosaki, R., Matsumoto, M., Ibe, S., Isobe, T., Tanaka, Y., Takahashi, T. (2006): Molecular pathology of Shprintzen- Goldberg syndrome. *Am J Med Genet A* **140**(1):104-8 323-6.
- Lee B, Godfrey M, Vitale E, Hori H, Mattei MG, Sarfarazi M, Tsipouras P, Ramirez F, Hollister DW. (1991): Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature*. Jul 25;352(6333):330–334

Legget, M.E., Unger, T.A., O'Sullivan, C.K., Zwink, T.R., Bennett, R.L., Byers, P.H., Otto, C.M. (1996): Aortic root complications in Marfan's syndrome: identification of a lower risk group. *Heart* **75**: 389–395.

Le Goff, C., Mahaut, C., Wang, L.W., Allali, S., Abhyankar, A., Jensen, S., Zylberberg, L., Collod-Beroud, G., Bonnet, D., Alanay, Y., Brady, A.F., Cordier, M.P., Devriendt, K., Genevieve, D., Kiper, P.Ö., Kitoh, H., Krakow, D., Lynch, S.A., Le Merrer, M., Mégarbane, A., Mortier, G., Odent, S., Polak, M., Rohrbach, M., Sillence, D., Stolte-Dijkstra, I., Superti-Furga, A., Rimoin, D.L., Topouchian, V., Unger, S., Zabel, B., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., Handford, P., Casanova, J.L., Boileau, C., Apte, S.S., Munnich, A., Cormier-Daire, V. (2011): Mutations in the TGFbeta binding-protein-like domain 5 of FBN1 are responsible for acromicric and geleophysic dysplasias. *Am J Hum Genet* **89**(1):7-14.

Lillie, M.A., David, G.J., Gosline, J.M. (1998): Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue. *Connect Tissue Res* **37**:121-41.

Liu, W., Qian, C., Comeau, K., Brenn, T., Furthmayr, H., Francke, U. (1996): Mutant fibrillin-1 monomers lacking EGF-like domains disrupt microfibril assembly and cause severe Marfan syndrome. *Hum Mol Genet* **5**:1581-7.

Loeys, B., Nuytinck, L., Delvaux, I., De Bie, S., De Paepe, A. (2001): Genotype and phenotype analysis of 171 patients referred for molecular study of the fibrillin-1 gene FBN1 because of suspected Marfan syndrome. *Arch Intern Med* **161**(20):2447–54.

Loeys, B., De Backer, J., Acker, P., Wettinck, K., Pals, G., Nuytinck, L., Coucke, P., De Paepe, A. (2004): Comprehensive molecular screening of the FBN1 gene favors locus homogeneity of classical Marfan syndrome. *Hum Mutat* **24**: 140–146.

Loeys, B.L., Chen, J., Neptune, E.R., Judge, D.P., Podowski, M., Holm, T., Meyers, J., Leitch, C.C., Katsanis, N., Sharifi, N., Xu, F.L., Myers, L.A., Spevak, P.J., Cameron, D.E., De Backer, J., Hellems, J., Chen, Y., Davis, E.C., Webb, C.L., Kress, W., Coucke, P., Rifkin, D.B., De Paepe, A.M., Dietz, H.C. (2005): A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* **37**(3):275–81.

Loeys, B.L., Dietz, H.C., Braverman, A.C., Callewaert, B.L., De Backer, J., Devereux, R.B., Hilhorst-Hofstee, Y., Jondeau, G., Faivre, L., Milewicz, D.M., Peyeritz, R.E., Sponseller, P.D., Wordsworth, P., De Paepe, A.M. (2010): The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet* **47**:476-485.

Loeys, B.L., Gerber, E.E., Riegert-Johnson, D., Iqbal, S., Whiteman, P., McConnell, V., Chillakuri, C.R., Macaya, D., Coucke, P.J., De Paepe, A., Judge, D.P., Wigley, F., Davis, E.C., Mardon, H.J., Handford, P., Keene, D.R., Sakai, L.Y., Dietz, H.C. (2010): Mutations in fibrillin-1 cause congenital scleroderma: stiff skin syndrome. *Sci Transl Med* **2**(23):23ra20

Maumenee, I.H. (1981): The eye in the Marfan syndrome. *Tr Am Ophth Soc* **79**: 684–733.

Milewicz, D.M., Pyeritz, R.E., Crawford, E.S., Byers, P.H. (1992): Marfan syndrome: defective synthesis, secretion, and extracellular matrix formation of fibrillin by cultured dermal fibroblasts. *J Clin Invest* **89**(1):79–86.

- Mizuguchi, T., Collod-Beroud, G., Akiyama, T., Abifadel, M., Harada, N., Morisaki, T., Ihara M, Kinoshita A, Yoshiura K, Junien C, Kajii T, Jondeau G, Ohta T, Kishino T, Furukawa Y, Nakamura Y, Niikawa N, Boileau C, Matsumoto, N. (2004): Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nature Genetics*, 36(8), 855–860. doi:10.1038/ng1392.
- Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., Heldin, CH. (1991): A role of the latent TGF- α 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- α 1. *EMBO J* 10:1091-1101
- Nakajima, Y., Miyazono, K., Kato, M., Takase, M., Yamagishi, T., Nakamura, H. (1997): Extracellular fibrillar structure of latent TGF α binding protein-1: role in TGF α -dependent endothelial-mesenchymal transformation during endocardial cushion tissue formation in mouse embryonic heart. *J Cell Biol* 136:193-204.
- Neptune, E. R., Frischmeyer, P. A., Arking, D. E., Myers, L., Bunton, T. E., Gayraud, B., Ramirez F, Sakai LY, Dietz, H. C. (2003). Dysregulation of TGF- β activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nature Genetics* 33(3), 407–411. doi:10.1038/ng1116
- Nijbroek, G., Sood, S., McIntosh, I. (1995): Francomano CA, Bull E, Pereira L, Ramirez F, Pyeritz RE, Dietz HC,. Fifteen novel FBN1 mutations causing Marfan syndrome detected by heteroduplex analysis of genomic amplicons. *Am J Hum Genet* 57:8-21.
- Pepe, G., Giusti, B., Sticchi, E., Abbate, R., Gensini, G.F., Nistri, S. (2016): Marfan syndrome: current perspectives. *Appl Clin Genet* 9:55-65.
- Pereira, L., D'Alessio, M., Ramirez, F., Lynch, J.R., Sykes, B., Pangilinan, T., Bonadio, J. (1993): Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet* 2: 1762.
- Pereira, L., Levrán, O., Ramirez, F., Lynch, J.R., Sykes, B., Pyeritz, R.E., Dietz, H.C. (1994): A molecular approach to the stratification of cardiovascular risk in families with Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 331(3):148–53.
- Porciani, M. C., Attanasio, M., Lepri, V., Lapini, I., Demarchi, G., Padeletti, L, Pepe, G., Abbate, R., Gensini, G.F. (2004): [Prevalence of cardiovascular manifestations in Marfan syndrome] *Italian Heart Journal* vol. 5, no. 8, pp. 647–652.
- Pyeritz, R.E., McKusick, V.A. (1979): The Marfan syndrome: diagnosis and management. *N Engl J Med* 300: 772–777.
- Pyeritz, R.E., Francke, U. (1993): The second international symposium on the Marfan syndrome. *Am J Med Genet* 47: 127–135.
- Pyeritz, R.E. (1993): The Marfan syndrome. In: Steinmann B, ed. *Connective tissue and its heritable disorders*. New York: Wiley-Liss, 437-68.
- Raghunath, M., Bachi, T., Meuli, M., Altermatt, S., Gobet, R., Bruckner-Tuderman, L., Steinmann, B. (1996): Fibrillin and elastin expression in skin regenerating from cultured keratinocyte autografts: morphogenesis of microfibrils begins at the dermo-epidermal junction and precedes elastic fiber formation. *J Invest Dermatol* 106:1090-5.
- Reinhardt, D.P., Keene, D.R., Corson, G.M., Pöschl, E., Bächinger, H.P., Gambee, J.M., Sakai, L.Y. (1996): Fibrillin-1: organization in microfibrils and structural properties. *J Mol Biol* 258:104-16.
- Reinhardt, D.P., Gambee, J.E., Ono, R.N., Bachinger, H.P., Sakai, L.Y. (2000): Initial steps in assembly of microfibrils. Formation of disulfide-cross-linked multimers containing fibrillin-1. *J Biol Chem* 275(3):2205–10.

- Robinson, P. N. (2000): The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *Journal of Medical Genetics*, 37(1), 9–25. doi:10.1136/jmg.37.1.9
- Robinson, P. N., Arteaga-Solis, E., Baldock, C., Collod-Beroud, G., Booms, P., De Paepe, A., Dietz HC, Guo G, Handford PA, Judge DP, Kielty CM, Loeys B, Milewicz DM, Ney A, Ramirez F, Reinhardt DP, Tiedemann K, Whiteman P, Godfrey, M. (2006): The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of Medical Genetics*, 43(10), 769–787. doi:10.1136/jmg.2005.039669.
- Robinson, P. N., Neumann, L. M., Demuth, S., Enders, H., Jung, U., König, R., Mitulla, B., Müller, D., Muschke, P., Pfeiffer, L., Prager, B., Somer, M., Tinschert, S. (2005): Shprintzen-Goldberg syndrome: Fourteen new patients and a clinical analysis. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 135A(3), 251–262. doi.org/10.1002/ajmg.a.30431.
- Roman, M.J., Rosen, S.E., Kramer-Fox, R., Devereux, R.B. (1993): Prognostic significance of the pattern of aortic root dilation in the Marfan syndrome. *J Am Coll Cardiol* 22: 1470–1476.
- Ross, J.M., McIntire, L.V., Moake, J.L., Kuo, H.J., Qian, R.Q., Glanville, R.W., Schwartz, E., Rand, J.H. (1998): Fibrillin containing elastic microfibrils support platelet adhesion under dynamic shear conditions. *Thromb Haemost* 79:155-61.
- Ruddy, J.M., Jones, J.A., Ikonomidis, J.S. (2013): Pathophysiology of thoracic aortic aneurysm (TAA): is it not one uniform aorta? Role of embryologic origin. *Prog Cardiovasc Dis* 56:68-73.
- Saharinen, J., Taipale, J., Keski-Oja, J. (1996): Association of the small latent transforming growth factor- α with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J* 15: 245-53.
- Saharinen, J., Keski-Oja, J. (2000): Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF β binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF- β . *Mol Biol Cell* 11(8):2691-704
- Sakai, L.Y., Keene, D.R., Engvall, E. (1986): Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103:2499-509.
- Sakai, L.Y., Keene, D.R., Glanville, R.W., Bachinger, H.P. (1991): Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem* 266:14763-70.
- Sakai, L. Y., Keene, D. R., Renard, M., & De Backer, J. (2016): FBN1 : The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene*, 591(1), 279 291. doi:10.1016/j.gene.2016.07.033.
- Sakamoto, H., Broekelmann, T., Cheresch, D.A., Ramirez, F., Rosenbloom, J., Mecham, R.P. (1996): Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem* 271:4916-22.
- Sasaki, T., Mann, K., Murphy, G., Chu, M.L., Timpl, R. (1996): Different susceptibilities of fibulin-1 and fibulin-2 to cleavage by matrix metalloproteinases and other tissue proteases. *Eur J Biochem* 240:427-34

- Shores, J., Berger, K.R., Murphy, E.A., Pyeritz, R.E. (1994): Progression of aortic dilatation and the benefit of long-term beta-adrenergic blockade in Marfan's syndrome. *N Engl J Med* 330: 1335–1341.
- Scherer, L.R., Arn, P.H., Dressel, D.A., Pyeritz, R.M., Haller Jr, J.A. (1988) : Surgical management of children and young adults with Marfan syndrome. *J Pediatr Surg*; 23: 1169–1172.
- Schrijver, I., Liu, W., Odom, R., Brenn, T., Oefner, P., Furthmayr, H., & Francke, U. (2002): Premature Termination Mutations in FBN1: Distinct Effects on Differential Allelic Expression and on Protein and Clinical Phenotypes. *The American Journal of Human Genetics*, 71(2), 223–237. doi:10.1086/341581
- Smallridge, R.S., Whiteman, P., Doering, K., Handford, P.A., Downing, A.K. (1999): EGF-like domain calcium affinity modulated by N-terminal domain linkage in human fibrillin-1. *J Mol Biol* 286:661-8.
- Sponseller, P.D., Hobbs, W., Riley, L.H. III, Pyeritz, R.E. (1995): The thoracolumbar spine in Marfan syndrome. *J Bone Joint Surg*;77:867-76.
- Stanger, O. H., Pepper, J. R., Svensson, L. G. (Eds.). (2019): *Surgical Management of Aortic Pathology*. Springer. Wien.
- Streeten, E.A., Murphy, E.A., Pyeritz, R.E. (1987): Pulmonary function in the Marfan syndrome. *Chest*; 91:
- Superti-Furga, A., Raghunath, M., Willems, P. J. (1992): Deficiencies of fibrillin and decorin in fibroblast cultures of a patient with neonatal Marfan syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 29(12), 875–878. doi:10.1136/jmg.29.12.875 408–412.
- Tomo, I.M. (2008): Marfanov syndróm. *Bedecker zdravia – RE-PUBLIC s.r.o.* 104–105
- Tynan, K., Comeau, K., Pearson, M., Wilgenbus, P., Levitt, D., Gasner, C., Berg MA, Miller DC Francke, U. (1993): Mutation screening of complete fibrillin-1 coding sequence: report of five new mutations, including two in 8-cysteine domains. *Human Molecular Genetics*, 2(11), 1813–1821. doi:10.1093/hmg/2.11.1813
- Verstraeten, A., Maaïke, A., van Laer, L., Loeys, B. (2016): Marfan Syndrome and Related Disorders: 25 Years of Gene Discovery. *Human Mutation*. 37(6), 524-531. DOI: 10.1002/humu.22977.
- Voyvodic, F., Scroop, R., Sanders, R.R. (1999) : Anterior sacral meningocele as a pelvic complication of Marfan syndrome. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 39: 262–265.
- de Vries, B.B., Pals, G., Odink, R., Hamel, B.C. (2007): Homozygosity for a FBN1 missense mutation: clinical and molecular evidence for recessive Marfan syndrome. *Eur J Hum Genet* 15(9):930-5
- Winship, P.R., Dragon, A.C. (1991): Identification of haemophilia B patients with mutations in the two calcium binding domains of factor IX: importance of a α -OH Asp 64 Asn change. *Br J Haematol* 77:102-9.
- Wood, J.R., Bellamy, D., Child, A.H., Citron, K.M. (1984) : Pulmonary disease in patients with Marfan syndrome. *Thorax* 39: 780–784.

- Yin, W., Smiley, E., Germiller, J., Sanguineti, C., Lawton, T., Pereira, L., Ramirez, F., Bonadio, J. (1995): Primary structure and developmental expression of Fbn-1, the mouse fibrillin gene. *J Biol Chem* 270:1798-806.
- Yuan, X., Downing, A.K., Knott, V., Handford, P.A. (1997): Solution structure of the transforming growth factor α -binding protein-like module, a domain associated with matrix fibrils. *EMBO J* 16:6659-66.
- Yule, S.R., Hobson, E.E., Dean, J.C.S., Gilbert, F.J. (1999): Protrusio acetabuli in Marfan's syndrome. *Clin Radiol* 54: 95–97.
- Zhang, H. (1994): Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *The Journal of Cell Biology*, 124(5), 855–863. doi:10.1083/jcb.124.5.855.
- Zhang, H., Hu, W., Ramirez, F. (1995): Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 129:1165-76.